

**BINDUNG VON PHARMAKA AN DIE
MENSCHLICHE HAUT**

KERSTEN WALTER

1987



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und
Toxikologie der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. W. Forth

BINDUNG VON PHARMAKA AN DIE

MENSCHLICHE HAUT

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Kersten Walter

aus

Hannover

München 1987

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. H. Kurz

Mitberichterstatter: 1) Prof. Dr. W. Forth

2) Dr. med. habil. M. Meurer

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 2.3.1987

Meinen Eltern in Dankbarkeit

Herrn Prof. Dr. H. Kurz danke ich für die Überlassung des Themas und für die Anregungen zur Durchführung und Darstellung der Arbeit.

Herrn Dr. med. habil. B. Fichtl danke ich für seine kritischen Diskussionsbeiträge, für seine Beratung bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse und für die Mitbenutzung seiner Rechnerprogramme.

Herrn Dr. med. habil. H.C. Korting danke ich für die Durchführung, die Begutachtung und das Fotografieren der histologischen Schnitte.

Herrn Prof. Dr. Dr. U. Welsch danke ich für seine Beratung und Hilfe bei der Abbildung der histologischen Schnitte.

ABKÜRZUNGEN

B	gebundener Anteil des Pharmakons
c_b	gebundene Konzentration des Pharmakons
c_f	freie Konzentration des Pharmakons im Gewebewasser
c_f'	freie Konzentration des Pharmakons in der gewebefreien Dialysekammerhälfte
Ci	Curie
cpm	Impulse pro Minute (counts per minute)
c_T	gesamte Pharmakonkonzentration im Gewebe
dpm	Zerfälle pro Minute (decays per minute)
F	freier Anteil des Pharmakons
g	Gramm; Erdbeschleunigung
n	Versuchsanzahl
r	Korrelationskoeffizient
r_s	Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman
SPV	Sulpho-Phospho-Vanillin Reaktion
s	Standardabweichung
$s_{\bar{x}}$	Standardfehler des Mittelwertes
VK	Verteilungskoeffizient
$\bar{x}$	Mittelwert

INHALTSÜBERSICHT

	Seite
A. <u>Einleitung</u>	1
B. <u>Ergebnisse</u>	9
1. Auswahl der Pharmaka	9
2. Bindung der Pharmaka an Epidermis und Corium	9
2.1. Vergleich der Bindung der Pharmaka an Epidermis und Corium	13
3. Faktoren, die die Bindung der Pharmaka beeinflussen	14
3.1. Konzentrationsabhängigkeit der Pharmakonbindung an Epidermis und Corium	14
3.2. pH-Abhängigkeit der Bindung von Pharmaka an Epidermis und Corium	17
3.3. Beeinflussung der Bindung durch die Gewebeproben	20
3.3.1. Abhängigkeit der Bindung vom Gesamtlipidgehalt	21
3.3.2. Abhängigkeit der Bindung vom Stickstoffgehalt	22
3.3.3. Abhängigkeit der Bindung vom Wassergehalt	25
3.3.4. Einfluß der Lokalisation der entnommenen Hautprobe auf die Bindung	25
3.4. Zusammenhang zwischen der Bindung und der Lipidlöslichkeit der Pharmaka	26
3.4.1. Vergleich der drei verwendeten Lipidphasen	31
4. Bindung von Pharmaka an entfettete Epidermis- und Coriumproben	33
4.1. Vergleich der zwei Extraktionsmittel	36

	Seite
C.	Diskussion 38
1.	Kritik der Methodik 38
1.1.	Präparation der Hautschichten 38
1.1.1.	Epidermis 38
1.1.2.	Corium 40
1.2.	Die Versuchsbedingungen 43
1.2.1.	Wahl der Inkubationstemperatur 43
1.2.2.	pH-Wert der Inkubationslösung 43
1.2.3.	Dialyse 44
1.2.4.	Einfluß des Gefrierens 46
1.3.	Berechnung der Bindung 47
1.3.1.	Konzentration des Pharmakons im Gewe-
	wasser 47
1.3.2.	Konzentration des Pharmakons im Gewebe 47
1.4.	Metabolismus 48
1.5.	Bestimmung des Gesamtlipidgehaltes 49
2.	Diskussion der Ergebnisse 49
2.1.	Bindung an Epidermis und Corium 49
2.2.	Konzentrationsabhängigkeit der Bindung 52
2.3.	pH-Abhängigkeit der Bindung 53
2.4.	Abhängigkeit der Bindung von der Lipid-
	löslichkeit der Pharmaka 54
2.5.	Interindividuelle Schwankungen der
	Pharmakonbindung 56
2.6.	Vergleich der bestimmten Parameter
	(Gesamtlipid- und Stickstoffgehalt) der
	Haut mit Literaturangaben 58
2.7.	Beeinflussung der Bindung durch die
	Gewebelipide 60
2.8.	Zusammenhang zwischen der Bindung an
	Epidermis und Corium und andere Gewebe 61
2.9.	Zusammenhang zwischen der Bindung an
	Epidermis bzw. Corium und dem Plasma 65

	Seite
2.10.	Vergleich der in vitro Bindung mit in vivo gefundenen Daten 68
2.11	Quantitative Bedeutung der Pharma- konbindung an die Haut 69
D.	<u>Methodik</u> 74
1.	Gewebeproben 74
2.	Präparation der Hautschichten 74
2.1.	Epidermis 74
2.2.	Corium 76
2.2.1.	Gefriermikrotom 76
2.2.2.	Herstellung von Schnitten aus frischem Gewebe 77
3.	Herstellung der Pharmakonlösungen 78
4.	Bindung von Pharmaka an Epidermis und Corium 78
4.1.	Inkubation in Dialysezellen 80
4.2.	Entfettung des Gewebes für die Bindungsversuche 83
4.3.	Dauer der Dialyse 84
4.4.	Bestimmung des Wassergehaltes des Gewebes 87
4.5.	Analytik der Pharmaka 88
4.5.1.	Bestimmung der Pharmakonkonzentration in Flüssigkeiten 89
4.5.2.	Bestimmung der Pharmakonkonzentration im Gewebe 90
4.5.3.	HPLC-Messungen 91
4.6.	Auswertung der Ergebnisse 93
5.	Bestimmung des Gesamtlipidgehaltes der Gewebeproben 95
6.	Bestimmung des Stickstoffgehaltes der Proben 97

	Seite
7.	Bestimmung des Proteingehaltes in Lösungen 98
8.	Bestimmung des Verteilungskoeffizienten 98
8.1.	Oktanol und Heptan 98
8.2.	Extrahiertes Hautfett 99
8.2.1.	Extraktion des Hautfettes zur Bestim- mung des Verteilungskoeffizienten 100
8.2.2.	Dünnschichtchromatographie des Lipid- extraktes 101
8.2.3.	Bestimmung des Phosphatgehaltes des Lipidextraktes 102
9.	Rechnerische Auswertung und Darstel- lung der Daten 102
E.	<u>Tabellenanhang</u> 103
F.	<u>Zusammenfassung</u> 113
G.	<u>Literaturverzeichnis</u> 116
H.	<u>Lebenslauf</u> 142

A.

EINLEITUNG

Wird ein Pharmakon verabreicht, durchläuft es die Phasen der Resorption, Verteilung, Metabolisierung und Ausscheidung. Die Verteilung eines Pharmakons wird wesentlich durch die unspezifische Bindung an die Plasmaproteine und das extravaskuläre Gewebe beeinflusst.

Die Plasmaproteinbindung ist eingehend untersucht. Sie ist ein klassischer Parameter zur Charakterisierung der pharmakokinetischen Eigenschaften eines Pharmakons (Goldstein 1949; Meyer und Guttman 1968; Jusko und Gretch 1976; Kurz 1978; Lindup und Orme 1981; Müller 1982). In einigen dieser Arbeiten wird immer wieder auf die mögliche pharmakokinetische Bedeutung der Bindung von Pharmaka an das Gewebe hingewiesen. Bei einem Vergleich der Massenanteile des Plasma- bzw. Geweberaumes wird deutlich, daß für ein appliziertes Pharmakon die Gewebefixierung pharmakokinetisch bedeutender sein kann als die Bindung an die Plasmaproteine (Abb. 1).

Dieser Sachverhalt erklärt das gestiegene Interesse für die Bindung von Pharmaka an Gewebe in den letzten Jahren. Die Untersuchungen wurden *in vivo* und *in vitro* meist an den gut durchbluteten Organen Gehirn, Herz, Niere, Lunge und Leber durchgeführt (Goldbaum und Smith 1954; Salzman und Brodie 1956; Kuntzmann et al. 1967; Höllt und Teschemacher 1975; Lin et al. 1982; Igari et al. 1982, 1983; Harashima et al. 1985). Auch für das größte Organ des Menschen, das Muskelgewebe, konnte gezeigt werden, daß Pharmaka in großem Ausmaß gebunden werden können (Fichtl 1974, 1983; Fichtl und Kurz 1978).

Aus den Ergebnissen dieser Arbeiten konnte auf die theoretischen Grundlagen des Einflusses der Plasma- und Gewebefixierung auf die Kinetik von Pharmaka geschlossen werden (Curry 1970; Gilette 1973; Jusko und Gretch 1976;

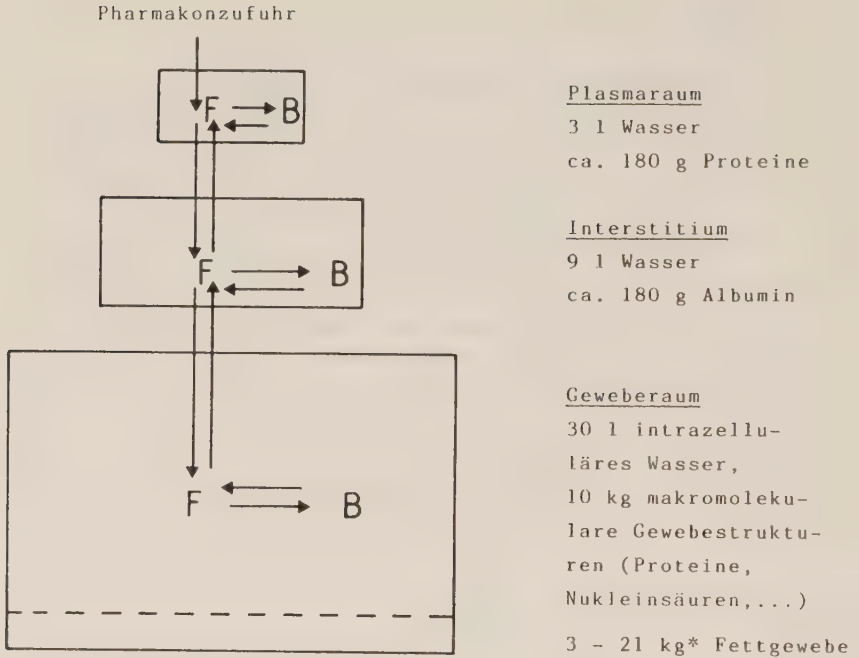


Abb. 1:

Vereinfachtes Modell der Verteilung eines Pharmakons im Organismus (modifiziert nach Gibaldi und Mc Namara 1978).

F = freier Anteil des Pharmakons

B = gebundener Anteil des Pharmakons

Gibaldi und Mc Namara 1978; Gibaldi und Koup 1981; Tozer 1981).

Danach ergeben sich durch die Gewebefindung folgende Konsequenzen für die Kinetik eines Pharmakons im Organismus:

* Bickel (1984)

Durch die Gewebefindung von Pharmaka wird ihr Verteilungsvolumen beeinflusst, das sich aus der Gesamtmenge des Pharmakons im Körper (D) und der Plasmakonzentration (c) errechnen läßt (Gl. 1).

$$V = \frac{D}{c} \quad (\text{Gl. 1})$$

Infolge der Beeinflussung des Verteilungsvolumens kann auch die Halbwertszeit eines Pharmakons vom Ausmaß der Gewebefindung eines Pharmakons abhängen. Die Halbwertszeit eines Pharmakons ($t_{1/2}$) läßt sich aus seinem Verteilungsvolumen (V) sowie der Ausscheidungskapazität für das Pharmakon (bestimmt als totale Körperclearance Cl_{tot}) berechnen (Gl. 2).

$$t_{1/2} = \ln 2 \cdot \frac{V}{Cl_{\text{tot}}} \quad (\text{Gl. 2})$$

Durch den Einfluß auf diese zwei wichtigen pharmakokinetischen Parameter läßt sich die Bedeutung der Gewebefindung für die Dosierung bzw. Dosierungsintervalle eines Pharmakons erkennen.

Für die Haut, die nach dem Muskel zusammen mit dem Fettgewebe das zweitgrößte Organ des Menschen ist, beschränken sich pharmakokinetische Untersuchungen hauptsächlich auf die Penetration topisch applizierter Pharmaka (Ainsworth 1960; Feldman und Maibach 1965; Scheuplein und Blank 1971; Osamura 1982; Swarbrick et al. 1984). In den letzten Jahren gab es zusätzliche in vivo Untersuchungen, wann und in welchem Ausmaß oral bzw. intravenös verabreichte Pharmaka in der Blasenflüssigkeit der Haut zu finden sind (Lauharanta et al. 1982; Schäfer-Korting et al. 1984, 1985, 1986).

Systematische Untersuchungen über die Bindungseigenschaften der Haut für Pharmaka sind in der Literatur

<u>Stoff bzw. Pharmakon</u>		<u>Hautschicht</u>
Phenobarbital, Thio- pental, Barbital, Pento- barbital, Amytal	E, C	Goldblum et al. (1954)
Testosteron, Benzyl- alkohol	E, C	Menczel und Maibach (1972)
Bilirubin	E	Kapoor et al. (1973)
Methotrexat	E	Taylor und Halprin (1977)
5-MOP, 8-MOP	E	Artuc et al. (1979)
5-MOP, 8-MOP, Östra- diol, Thiopyronin, Theophyllin	E	Artuc et al. (1980)
β -Karotin, Retinol, Dehydroretinol	E, C	Vahlquist et al. (1982)
Malathion	E, C	Menczel et al. (1983)
Retinol	E, C	Tormä und Vahlquist (1984)
Lindan	E, C	Menczel et al. (1984)
β -Karotin, Cantha- xanthin, Etretnat, Retinol, Dehydroretinol	E	Rollman und Vahlquist (1985)

Tab. 1:

Literaturübersicht von Arbeiten, die sich mit der Aufnahme von Stoffen bzw. Pharmaka in die Haut beschäftigen. Die Untersuchungen wurden in vivo oder in vitro an verschiedenen Spezies (Mensch, Ratte, Meerschweinchen) durchgeführt.

E = Epidermis

C = Corium

nicht zu finden. Ein Überblick über einige Arbeiten, die sich mit der Anreicherung einzelner Stoffe bzw. Pharmaka in der Haut bzw. den Hautschichten beschäftigt haben, ist in Tabelle 1 zu sehen.

Aufgrund der Ergebnisse dieser Untersuchungen läßt sich erkennen, daß die Haut bzw. bestimmte Hautschichten in der Lage sind Pharmaka aufzunehmen. Diese Vermutung wird noch durch die Tatsache gestützt, daß bei in vivo Verteilungsstudien, in denen die Haut mit untersucht wurde, teilweise hohe Pharmakonkonzentrationen in diesem Organ gefunden wurden (Newbold 1974; Lin et al. 1982; Igari et al. 1982; Yoshikawa et al. 1984; Tsuji et al. 1985; Siefert et al. 1986).

Für uns erschien es interessant wegen der möglichen Bindungseigenschaften der Haut und ihres großen Anteils am Körpergewicht (ca. 10%) folgender Fragestellung nachzugehen:

- In welchem Ausmaß werden Pharmaka an die Epidermis und das Corium des Menschen gebunden?
- Durch welche Faktoren wird die Pharmakonbindung an die beiden Hautschichten beeinflußt?
- Ist die Bindung von Pharmaka an die zwei Hautschichten vergleichbar mit der Bindung an das Plasma bzw. andere Gewebe?
- Hat die Haut als Verteilungsorgan eine ähnliche pharmakokinetische Bedeutung wie die Bindung von Pharmaka an das Plasma bzw. andere Gewebe?

In der Literatur findet man Arbeiten, die auf eine Bindung von Pharmaka bei der topischen Applikation hinweisen (Menczel und Maibach 1970; Slaga et al. 1977; Baker et al. 1977; Dalvi und Zatz 1982; Bronaugh und Congdon 1984; Markantonis et al. 1986). Da immer wieder betont wird, daß diese Fragestellung nicht ausreichend unter-

sucht ist, könnte die vorliegende Arbeit zusätzlich beantworten, in welchem Ausmaß auch topisch applizierte Pharmaka gebunden werden (Wester und Maibach 1983; Guy 1985; Menczel et al. 1985).

Die Haut

Zum besseren Verständnis der Untersuchungen und Ergebnisse soll das untersuchte Organ kurz charakterisiert werden.

Die Haut wird in drei Schichten unterteilt: Epidermis, Corium und Subcutis (Abb. 2).

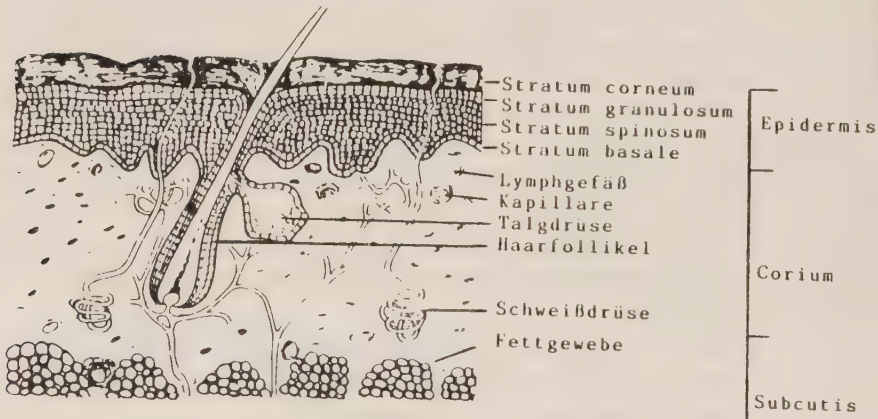


Abb. 2:

Schematischer Querschnitt der Haut. Neben der Unterteilung der Haut in Epidermis, Corium und Subcutis sind die einzelnen Schichten der Epidermis und Bestandteile des Coriums zu sehen.

	EPIDERMIS	CORIUM
	nicht durchblutet	durchblutet
<u>STRUKTUR:</u>	zellreiches Gewebe, dessen äußere Zellschicht abgestorben ist (Anteil des Interstitiums je nach Zellschicht ca. 15 % ^{a)})	zellarmes Gewebe (ca. 60 % des Coriums bestehen aus Interstitium ^{b)})
<u>CHARAKTERISTISCHES</u>		
<u>SKLEROPROTEIN:</u>	Keratine und Derivate (62-75 % vom Trockengewicht ^{c)})	Kollagen (ca. 75 % vom Gesamtprotein-gehalt ^{d)})
<u>LIPIDE:</u>	5,8 % vom Feuchtgewicht (Phospholipidreich; in den lebenden Epidermisschichten bis zu 60 % des Gesamtlipidgehaltes ^{e,f)})	3,5 % vom Feuchtgewicht (Qualitative und quantitative Zusammensetzung vom Gehalt an Talgdrüsen abhängig)
<u>WASSERGEHALT:</u>	ca. 72 % in den lebenden Epidermisschichten; 2 % im Stratum corneum ^{g)})	ca. 71 % ^{g)}

Tab. 2:

Gegenüberstellung von Epidermis und Corium
(Zusammensetzung und Morphologie).

- a) Halprin und Ohkawara 1967; b) Jusko und Gretch 1976;
 c) Matoltsy und Herbst 1956; d) Tajima et al. 1982;
 e) Long 1970; f) Gray und Yardley 1975;
 g) Stüttgen und Schäfer 1974;

Auf Grund ihrer Zusammensetzung wird die Subcutis aus pharmakokinetischer Sicht als Teil des Fettgewebes betrachtet. Deshalb beschränkten wir die Untersuchungen auf die Epidermis und das Corium.

Epidermis und Corium machen zusammen ca. 10 % des Körpergewichtes aus. Da sich die Hautschichten in Gestalt und Zusammensetzung sehr unterscheiden, wurden sie getrennt auf ihre Bindungseigenschaften untersucht. Eine Gegenüberstellung der beiden Hautschichten (Zusammensetzung und Morphologie) ist in Tabelle 2 zu sehen.

B. ERGEBNISSE

1. Auswahl der Pharmaka:

Zur Untersuchung der Bindung von Pharmaka an die Haut wurden zehn Arzneistoffe verwendet. Wie in Tabelle 1 zu sehen ist, wurden in den bisherigen Arbeiten maximal fünf Pharmaka, meist einer Stoffgruppe, untersucht. Es ist aber bekannt, daß die Gewebefindung von Pharmaka von ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften abhängen kann (Kurz und Fichtl 1983; Lien 1985). Daher wurden die zehn Pharmaka so gewählt, daß ein breites Spektrum dieser Eigenschaften erfaßt wird. So unterscheiden sich die Pharmaka in der Art der Ladung, dem Ionisationsgrad bei pH 7,0 und der Lipidlöslichkeit.

Es wurden fünf Säuren und fünf Basen untersucht. Ihr Ionisationsgrad bei pH 7,0 reicht von beinahe 0 % (Diazepam) bis zu 99,9 % (Salicylsäure). Die Lipidlöslichkeit, bestimmt als Lipid-Wasser-Verteilungskoeffizient, umfaßt bis zu sechs logarithmische Einheiten (Heptan).

Die Verteilungskoeffizienten wurden mit einer polaren (Oktanol), einer unpolaren (Heptan) und einer physiologischen Lipidphase (Hautfett) bestimmt (Tab. 3).

Für zwei der untersuchten Pharmaka, nämlich Isotretinoin und Ketoconazol, ist die Haut bei systemischer Anwendung das Zielorgan.

2. Bindung der Pharmaka an Epidermis und Corium:

Die Bindung der Pharmaka an die verschiedenen Schichten der Haut wurde nach Inkubation in einer Pharmakonlösung (10^{-6} Mol/l) bestimmt.

PHARMAKON	ABK.	pK _a	% ion. (pH 7,0)	OKTANOL	HEPTAN	VERTEILUNGSKOEFFIZIENT (pH 7,0)* HAUTFETT
CLONIDIN	CLO B	8,25 ^a	94,67	3,0	5,8·10 ⁻³	0,95
DIAZEPAM	DIZ B	3,31 ^a	0,02	720,0	91,5	261,60
IMIPRAMIN	IMI B	9,40 ^a	99,60	146,0	47,3	24,10
ISOTRETINOIN	ISO S	3,80 ^b	99,73	631,7	228,1	52,45
KETOCONAZOL	KET B	2,9;6,51 ^b	24,44	5310,5	4,8	553,30
PHENOBARBITAL	PHB S	7,30 ^a	33,38	21,0	5,0·10 ⁻³	1,30
PHENÝTOIN	PHT S	8,33 ^a	4,46	289,0	7,4·10 ⁻³	19,53
PROPRANOLOL	PRO B	9,50 ^a	99,68	5,4	4,6·10 ⁻²	8,62
SALICYLSÄURE	SAL S	3,00 ^a	99,99	2·10 ⁻²	1,8·10 ⁻⁴	1,3·10 ⁻³
WARFARIN	WAR S	5,00 ^c	99,01	28,8	6,4·10 ⁻³	1,80

Tab. 3:

Physikalisch-chemische Daten der verwendeten Pharmaka.

* Ermittelt als Lipid-Wasser-Verteilungskoeffizient zwischen den angegebenen

Lipidphasen und Phosphatpuffer (pH 7,0; 0,125 Mol/l)

Literaturquelle: a) Herzfeldt (1980) b) Firmenangabe c) Martindale (1977)

B = Base

S = Säure

Durch Messen der Gleichgewichtskonzentration des Pharmakons im Gewebe und der freien Pharmakonkonzentration im Gewebewasser konnte die Bindung errechnet werden (siehe Methodik). Sie wird angegeben als der gebundene Anteil in Prozent (% B) und als der Quotient aus gebundenem und freien Anteil (B/F-Wert).

Wie in den Abbildungen 3a und 3b zu sehen ist, wurden alle Pharmaka an beide Hautschichten gebunden.

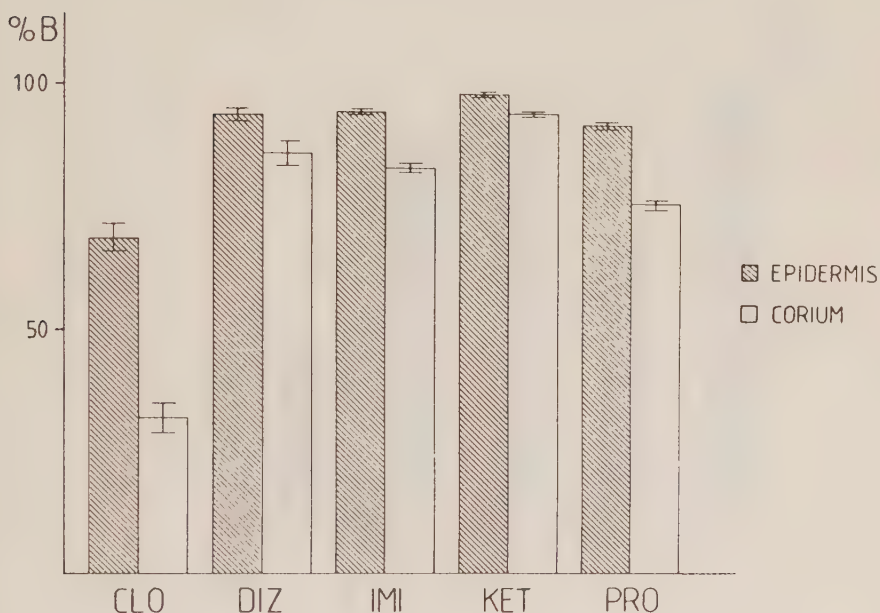


Abb. 3a:

Bindung der basischen Pharmaka an Epidermis und Corium; angegeben ist der gebundene Anteil (% B) bei einer Pharmakonkonzentration von 10^{-6} Mol/l. ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$; n=8-12)

CLO = Clonidin; DIZ = Diazepam; IMI = Imipramin;
KET = Ketoconazol; PRO = Propranolol;

In der Epidermis reichte der gebundene Anteil von 40,6 % (Salicylsäure) bis zu 99,5 % (Isotretinoin). Im Corium umfaßte die Bindung (% B) eine Spanne von 32 % (Clonidin) bis zu 97,8 % (Isotretinoin) (Tab. 1 Anhang).

Das Verhältnis der B/F-Werte für die niedrigste bzw. höchste Bindung zeigt die unterschiedlichen Bindungseigenschaften der Pharmaka deutlicher. So verhalten sich die B/F-Werte der oben genannten Pharmaka für das Corium wie 1:113 und für die Epidermis sogar wie 1:292.

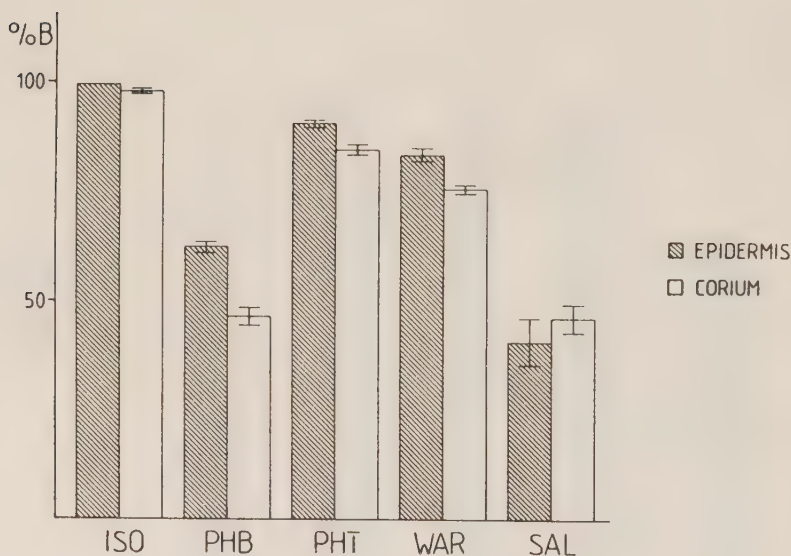


Abb. 3b:

Bindung der sauren Pharmaka an Epidermis und Corium; angegeben ist der gebundene Anteil (% B) bei einer Pharmakonkonzentration von 10^{-6} Mol/l. ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$; n=8-12)

ISO = Isotretinoin; PHB = Phenobarbital; PHT = Phenytoin;
WAR = Warfarin; SAL = Salicylsäure;

2.1. Vergleich der Bindung der Pharmaka an Epidermis und Corium:

Vergleicht man die Bindung der Pharmaka an die Epidermis mit der an das Corium, ist ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Bindung an beide Hautschichten festzustellen (Abb. 4).

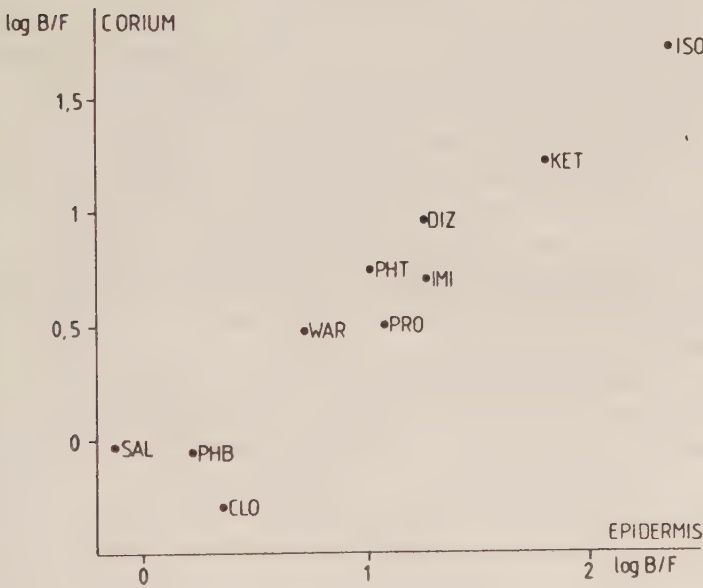


Abb. 4:

Zusammenhang zwischen der Bindung an die Epidermis und das Corium.

$$r = 0,95 \quad p < 0,001$$

$$\log B/F_{\text{Epidermis}} = 0,806 \cdot \log B/F_{\text{Corium}} - 0,201$$

Bei einem Vergleich der Bindungswerte der Hautschichten fällt auf, daß die Epidermis neun der zehn untersuchten Pharmaka signifikant höher bindet als das Corium ($p < 0,01$). Die B/F-Quotienten der Epidermis liegen bis zum 4,6-fachen (Clonidin) höher als die des Coriums. Einzige Ausnahme ist die Salicylsäure, deren Bindung an Epidermis und Corium nicht signifikant verschieden ist. Für das Corium liegt der gebundene Anteil sogar höher (46,01 %) als bei der Epidermis (40,6 %).

Da die Epidermis einen geringeren Wassergehalt als das Corium hat (Tab. 2), könnte dies ein Grund für die unterschiedliche Bindung der beiden Hautschichten sein. Durch das Inkubieren nimmt die Epidermis aber Wasser auf, so daß sich dieser Unterschied verliert. So ließ sich für 49 Epidermis- und Coriumstichproben kein signifikanter Unterschied im Wassergehalt finden ($p = 0,075$). Dieses Ergebnis wird bestätigt, wenn man die Bindung statt auf das Feuchtgewicht (B/F) auf das Trockengewicht (B'/F)* bezieht.

Auf andere mögliche Gründe der meist unterschiedlichen Bindung von Epidermis und Corium soll noch in der Diskussion (C.2.7. - C.2.9.) eingegangen werden.

3. Faktoren, die die Bindung der Pharmaka beeinflussen:

3.1. Konzentrationsabhängigkeit der Pharmakonbindung an Epidermis und Corium:

Die Bindung an die beiden Hautschichten wurde üblicherweise bei einer Pharmakonkonzentration von 10^{-6} Mol/l

$$* \frac{B'}{F} = \frac{\text{(gebundene Menge Pharmakon / kg Trockengewicht)}}{\text{(Konzentration des freien Pharmakons im Gewebewasser)}}$$

bestimmt. Von der Bindung der Pharmaka an Gewebe ist bekannt, daß sie konzentrationsabhängig sein kann (Ludden et al. 1976; Fichtl et al. 1980). Deshalb wurde für sechs Arzneistoffe untersucht, ob ihre Bindung an Epidermis und Corium von der Pharmakonkonzentration beeinflusst wird.

EPIDERMIS

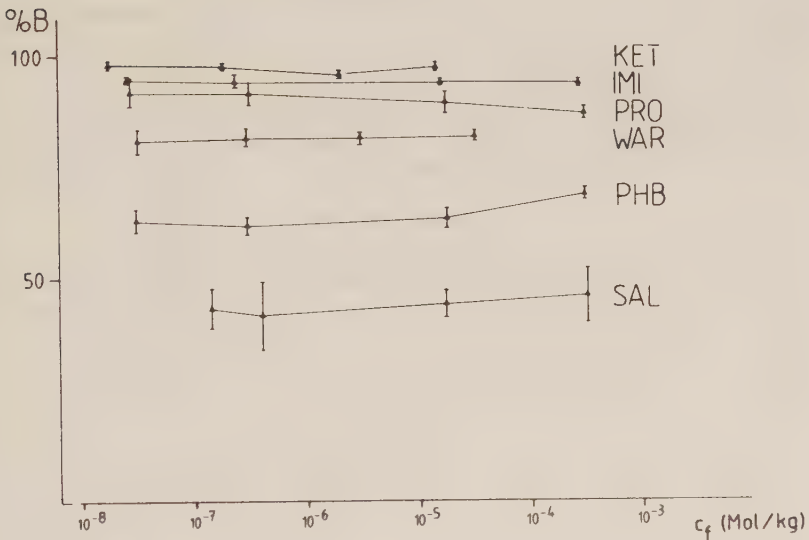


Abb. 5a:

Konzentrationsabhängigkeit der Bindung von Pharmaka an die Epidermis; aufgetragen ist der gebundene Anteil (% B) und die freie Pharmakonkonzentration im Gewebewasser (c_f).

($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$; $n=4-6$)

KET = Ketoconazol; IMI = Imipramin;
 WAR = Warfarin; PRO = Propranolol;
 PHB = Phenobarbital; SAL = Salicylsäure;

Die Versuche wurden in einem Konzentrationsbereich von 10^{-7} Mol Pharmakon/l bis 10^{-3} Mol Pharmakon/l durchgeführt. In den Abbildungen 5a und 5b ist für Epidermis und Corium die Bindung der Pharmaka über den gesamten Konzentrationsbereich gezeigt.

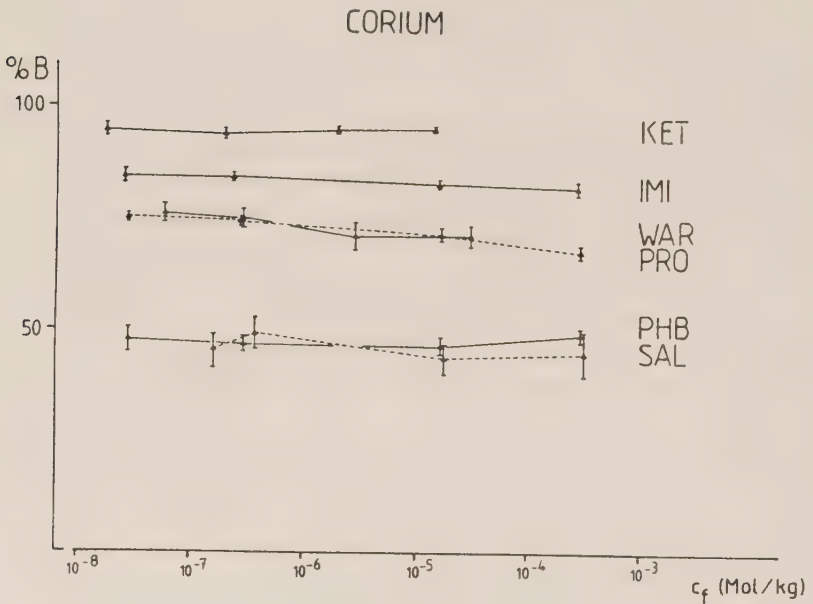


Abb. 5b:

Konzentrationsabhängigkeit der Bindung von Pharmaka an das Corium; aufgetragen ist der gebundene Anteil (% B) und die freie Pharmakonkonzentration im Gewebewasser (c_f). ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$; $n=4-6$)

KET = Ketoconazol; IMI = Imipramin;

WAR = Warfarin; PRO = Propranolol;

PHB = Phenobarbital; SAL = Salicylsäure;

Mit Hilfe der Freundlich Isothermen (Gl. 3) wurde überprüft, ob eine statistisch signifikante Konzentrationsabhängigkeit der Bindung vorliegt.

$$c_b = k \cdot c_f^m \quad (\text{Gl. 3})$$

Bei dieser Art der Darstellung wird die gebundene Konzentration (c_b) gegen die freie Konzentration im Gewebewasser (c_f) im doppelt logarithmischen Maßstab aufgetragen. Bei einer konzentrationsunabhängigen Bindung hat die resultierende Gerade eine Steigung (m) von 1. Liegt eine konzentrationsabhängige Bindung vor, unterscheidet sich die Steigung (m) der Geraden signifikant von 1.

Für die untersuchten Pharmaka ließ sich mit dieser Darstellung für drei Beispiele eine von 1 signifikant geringere Steigung der Geraden berechnen. So war die Bindung von Propranolol in der Epidermis konzentrationsabhängig ($p < 0,01$). Im Corium war die Propranolol- und die Imipraminbindung ($p < 0,01$ bzw. $p < 0,05$) signifikant abhängig von der Pharmakonzentration (Tab. 2 Anhang).

Betrachtet man jedoch den großen Konzentrationsbereich in dem gemessen wurde (4 Dekaden) und die geringen Änderungen des B/F-Wertes (maximal Faktor 2), kann die Bindung an beide Hautschichten als weitgehend linear bezeichnet werden.

3.2. pH-Abhängigkeit der Bindung von Pharmaka an Epidermis und Corium:

Die Bindung von Pharmaka an Gewebe kann vom pH-Wert des Gewebes abhängen (Nosak 1983; Kurz und Fichtl 1983).

Für sechs Pharmaka untersuchten wir, ob ihre Bindung an die beiden Hautschichten vom pH-Wert abhängig ist.

Die Bindungsversuche mit Epidermis und Corium wurden üblicherweise bei pH 7,0 durchgeführt. Dieser pH-Wert für die Inkubationsflüssigkeit wurde gewählt, da im Extrazellulärraum der Haut das pH-Spektrum vom schwach sauren bis zum schwach alkalischen reicht (Szakall 1951). Um auch den unterschiedlichen pH-Verhältnissen der Haut zu entsprechen, wurden die Versuche über die pH-Abhängigkeit bei pH 6,4; pH 7,0 und pH 7,6 durchgeführt.

Die Bindung der Pharmaka im Corium war nicht pH-abhängig (Abb. 6b). In der Epidermis dagegen war die Bindung von Ketoconazol bei pH 6,4 signifikant erniedrigt. Für die fünf anderen Pharmaka war keine pH-Abhängigkeit der Bindung feststellbar (Abb. 6a).

Eine pH-Abhängigkeit der Gewebefindung von Pharmaka kann mit dem Ionisationsgrad und der Ladung zusammenhängen (Fichtl 1983). Die sechs Pharmaka wurden so ausgewählt, daß drei Basen und drei Säuren untersucht wurden. Dabei war aus jeder Gruppe ein schwach ionisiertes (Diazepam bzw. Phenytoin), ein mäßig ionisiertes (Ketoconazol bzw. Phenobarbital) und ein stark ionisiertes (Clonidin bzw. Isotretinoin) Pharmakon vertreten. Mit Ketoconazol und Phenobarbital wurden zwei Pharmaka untersucht, deren pK_a -Werte im Bereich von pH 6,4 bis pH 7,6 liegen. Dadurch ist die Änderung des Anteils der ionisierten Substanz im untersuchten pH-Bereich am größten (Tab. 3 Anhang). Da bei diesen Pharmaka praktisch keine pH-Abhängigkeit der Bindung zu finden ist, könnte dies ein Hinweis darauf sein, daß die Bindung vor allem in der nicht-ionisierten Form der Pharmaka erfolgt. Im Bereich von pH 6,4 bis pH 7,6 nimmt der nicht-ionisierte

Anteil der Basen zu und verringert sich gleichzeitig für die Säuren. Da keine wesentliche Bindungsänderung festzustellen ist, kann dies möglicherweise neben der Bindung nicht-ionisierter auch auf die ionisierter Moleküle hinweisen.

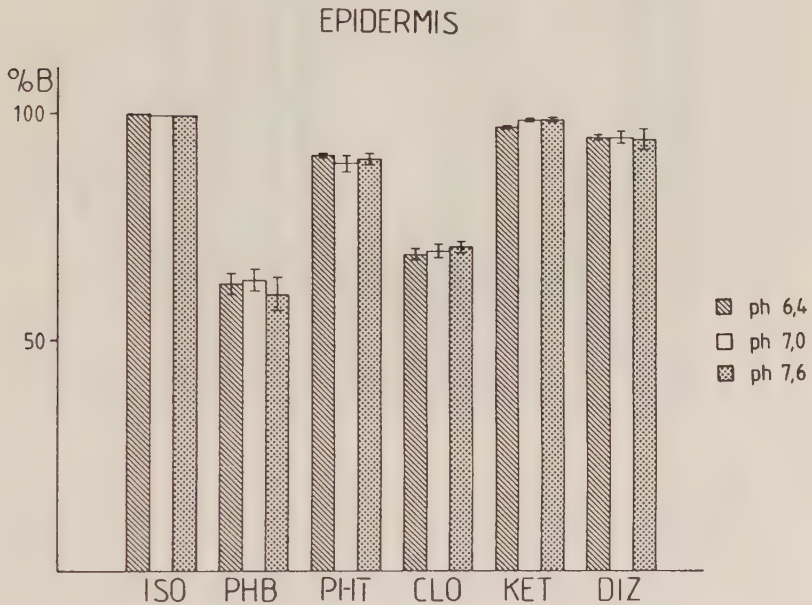


Abb. 6a:

pH-Abhängigkeit der Bindung von Pharmaka an die Epidermis; angegeben ist der gebundene Anteil (% B) bei einer Pharmakonzentration von 10^{-6} Mol/l. ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$; n=4-6)

ISO = Isotretinoin; PHB = Phenobarbital;

PHT = Phenytoin; CLO = Clonidin;

KET = Ketoconazol; DIZ = Diazepam;

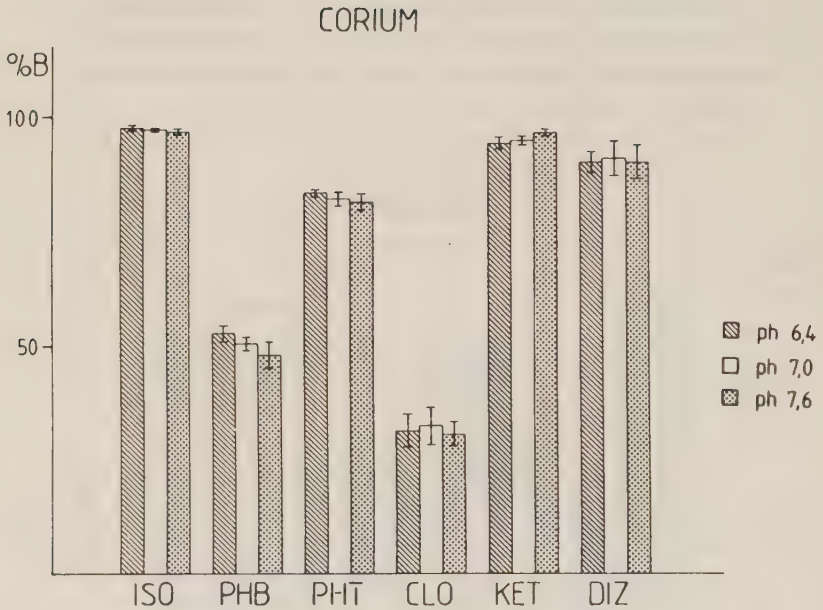


Abb. 6b:

pH-Abhängigkeit der Bindung von Pharmaka an das Corium; angegeben ist der gebundene Anteil (% B) bei einer Pharmakonkonzentration von 10^{-6} Mol/l. ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$; $n=4-6$)

ISO = Isotretinoin; PHB = Phenobarbital;

PHT = Phenytoin; CLO = Clonidin;

KET = Ketoconazol; DIZ = Diazepam;

3.3. Beeinflussung der Bindung durch die Gewebeproben:

Die verwendeten Hautproben stammten von unterschiedlichen Personen. In der Literatur gibt es viele Arbeiten,

die auf interindividuelle Unterschiede der Haut bzw. Hautschichten hinweisen (Patterson und Griesemer 1959; Reinertson und Wheatley 1959; Morsches et al. 1966; Adamčič und Fršer-Herman 1967; Worm 1981).

Darum wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen einfach zu bestimmenden Parametern für die einzelnen Proben und unterschiedlichen Bindungswerten besteht. Dazu wurden bei den Bindungsversuchen für jedes Pharmakon möglichst viele verschiedene Hautproben verwendet. Als Parameter für das Gewebe wurden der Gesamtlipidgehalt, der Stickstoffgehalt und der Wassergehalt nach der Inkubation bestimmt.

Der Gesamtlipidgehalt und der Stickstoffgehalt, als Parameter für den Proteingehalt, wurden am wasserfreien Gewebe bestimmt. An Hand des Trockengewichtes wurde ihr Anteil am Feuchtgewicht nach der Inkubation errechnet.

3.3.1. Abhängigkeit der Bindung vom Gesamtlipidgehalt:

Für 23 verschiedene Hautproben wurde der Gesamtlipidgehalt von Epidermis und Corium ermittelt.

Für die Epidermis variierte der Gesamtlipidgehalt zwischen 93,1 mg/g und 620 mg/g (vom Trockengewicht). Für das Corium wurden Werte von 54,1 mg/g bis 451,2 mg/g gefunden.

Aus allen Proben ergab sich ein Mittelwert für die Epidermis von 323,9 mg/g und für das Corium von 208,5 mg/g. Die Epidermis ist also signifikant lipidreicher als das Corium ($p < 0,01$). Dies trifft auch für den Lipidanteil im Feuchtgewicht zu. Für die Epidermis ergab sich ein durchschnittlicher Lipidanteil im Feuchtgewicht von 5,87 % und für das Corium von 3,51 % (Mittelwerte aus 48 Proben).

Vergleicht man die Bindungswerte von Epidermis und

Corium mit ihrem jeweiligen Gesamtlipidgehalt, lassen sich signifikante Zusammenhänge finden (Tab. 4a und 4b). Für die Epidermis ließ sich für die Basen Diazepam, Imipramin und Propranolol ein direkter Zusammenhang zwischen den Bindungswerten und dem Gesamtlipidgehalt erkennen. Für das Corium ergab sich eine signifikante, positive Korrelation für Diazepam, Ketoconazol und Isotretinoin. Diese drei Pharmaka sind die lipophilsten aller untersuchten Arzneistoffe (Verteilungskoeffizienten Tab. 3).

3.3.2. Abhängigkeit der Bindung vom Stickstoffgehalt:

Außer dem Gesamtlipidgehalt wurde für die Proben aus 3.3.1. auch der Stickstoffgehalt ermittelt. Die Bestimmung wurde mit dem nicht entfetteten Gewebe durchgeführt.

Für die Epidermis variierten die ermittelten Werte zwischen 5,04 % und 13,9 %. Für das Corium reichte die Spanne von 10,25 % bis 15,39 %. Daraus ergab sich für die Epidermis ein Mittelwert von 9,95 % und für das Corium durchschnittlich 13,8 % Stickstoffgehalt. Da Proteine einen durchschnittlichen Stickstoffgehalt von 16 % haben, läßt sich näherungsweise der Proteingehalt der Proben durch Multiplizieren mit 6,25 errechnen. Die Epidermis hat demnach einen Proteingehalt von 62,2 % und das Corium einen von 86,25 %.

Berechnet auf das nicht entfettete Trockengewicht ist die Epidermis stickstoffärmer als das Corium ($p < 0,001$).

Bei 14 Proben deren Stickstoffgehalt auch vom entfetteten Gewebe bestimmt wurde, ergab sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen Epidermis (14,9 %) und Corium (14,4 %).

	<u>Gesamtlipide</u>	<u>Stickstoff</u>	<u>Wasser</u>
CLONIDIN (n=7)	-0,67	0,43	-0,07
DIAZEPAM (n=11)	0,79**	0,56	-0,84**
IMIPRAMIN (n=7)	0,89*	0,57	-0,75*
KETOCONAZOL (n=9)	-0,01	0,78*	-0,62
PROPRANOLOL (n=7)	0,79*	0,67	-0,42
ISOTRETINOIN (n=7)	0,61	0,71	-0,57
PHENOBARBITAL (n=9)	0,19	0,52	-0,60
PHENYTOIN (n=10)	-0,33	0,66*	0,03
SALICYLSÄURE (n=8)	-0,55	0,38	0,21
WARFARIN (n=8)	0,14	0,76*	-0,64

Tab. 4a:

Spearman'scher Rangkorrelationskoeffizient (r_s) für die Beziehung zwischen den B/F-Werten der einzelnen Epidermisproben und ihrem Gesamtlipid-, Stickstoff- und Wassergehalt (alle in %).

* = $p < 0,05$ ** = $p < 0,01$

n = Anzahl der untersuchten Hautproben

	<u>Gesamtlipide</u>	<u>Stickstoff</u>	<u>Wasser</u>
CLONIDIN (n=7)	0,68	0,57	0,43
DIAZEPAM (n=11)	0,78**	0,27	-0,91***
IMIPRAMIN (n=7)	0,43	-0,07	-0,14
KETOCONAZOL (n=9)	0,69*	0,43	-0,80*
PROPRANOLOL (n=7)	-0,68	-0,57	0,57
ISOTRETINOIN (n=7)	0,78*	0,50	-0,50
PHENOBARBITAL (n=9)	0,01	0,21	-0,54
PHENYTOIN (n=10)	0,21	0,41	-0,60
SALICYLSÄURE (n=8)	-0,21	-0,07	-0,09
WARFARIN (n=8)	0,01	0,38	-0,59

Tab. 4b:

Spearman'scher Rangkorrelationskoeffizient (r_s) für die Beziehung zwischen den B/F-Werten der einzelnen Coriumpuben und ihrem Gesamtlipid-, Stickstoff- und Wassergehalt (alle in %).

* = $p < 0,05$ ** = $p < 0,01$ *** = $p < 0,002$

n = Anzahl der untersuchten Hautproben

Auf das Feuchtgewicht nach der Inkubation berechnet, ergaben sich für die Epidermis 2,16 % Stickstoffgehalt gegenüber 2,64 % des Coriums (Mittelwerte aus 48 Proben).

Ein direkter Zusammenhang zwischen den ermittelten Bindungsdaten und dem Stickstoffgehalt der Proben wurde für die Pharmaka Ketoconazol, Phenytoin und Warfarin gefunden. Diese signifikanten Korrelationen ließen sich nur für die Epidermis errechnen. Für das Corium war kein Zusammenhang zwischen dem Stickstoffgehalt und der Bindung erkennbar (Tab. 4b).

3.3.3. Abhängigkeit der Bindung vom Wassergehalt:

Nach der Inkubation war für die Proben ein unterschiedlicher Wassergehalt festzustellen. Da der Wassergehalt in die Berechnung der Bindung eingeht (Methodik 4.6.), wurde er für jede einzelne Probe ermittelt.

Bei vier Pharmaka ließ sich eine negative Korrelation zwischen der Bindung an Epidermis und Corium und dem Wassergehalt der Proben nach der Inkubation finden (Tab. 4a und 4b). Dieser umgekehrt proportionale Zusammenhang wurde bei den Pharmaka gefunden, die auch einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Bindung und dem Gesamtlipidgehalt zeigten. Ausnahmen bilden Isotretinoin und Propranolol, für die unter 3.3.1. eine signifikante Korrelation gefunden wurde, nicht aber für den Wassergehalt.

3.3.4. Einfluß der Lokalisation der entnommenen Hautprobe auf die Bindung:

Üblicherweise stammten die Hautproben von der Außenseite des Oberschenkels.

Für Isotretinoin und Ketoconazol wurde überprüft, ob sich ihre Bindung an der Oberschenkelhaut von der anderer Körperpartien unterscheidet. Dazu wurden von einer Person neben der Oberschenkelhaut zusätzlich Proben von Rücken und Bauch entnommen.

Für die Epidermis war für keines der beiden Pharmaka eine Änderung der Bindung in Abhängigkeit der Lokalisation der Haut festzustellen. Für die Bindung an das Corium dagegen ergaben sich für Isotretinoin und Ketoconazol signifikante Unterschiede (Tab. 4 Anhang).

Für Isotretinoin war der B/F-Wert der Bindung am Oberschenkelcorium um das 2,8-fache höher als an das Corium der Bauch- bzw. Rückenhaut. Für Ketoconazol unterschieden sich die B/F-Werte des Oberschenkelcoriums von denen der anderen Körperpartien maximal um den Faktor 1,4.

Auf die möglichen Gründe der unterschiedlichen Bindung an das Corium soll noch unter "Kritik der Methodik" (C.1.) eingegangen werden.

3.4. Zusammenhang zwischen der Bindung und der Lipidlöslichkeit der Pharmaka:

Die Lipidlöslichkeit von Pharmaka ist ein wichtiger Parameter zur Beurteilung pharmakologischer Eigenschaften (Kurz 1970; Kubinyi 1979; Lien 1985). Eine Anzahl von Autoren konnte einen Zusammenhang zwischen der Lipidlöslichkeit von Pharmaka und ihrer Proteinbindung zeigen (Scholtan 1968; Krieglstein 1973; Hempelmann und Heinz 1978; Seydel und Schaper 1982; Ebling et al. 1986). Auch für verschiedene Gewebe konnte ein Zusammenhang zwischen Ausmaß der Bindung der Pharmaka und ihrer Lipidlöslichkeit gezeigt werden (Leo et al. 1971; Kurz und Fichtl 1983).

Ein Vergleich, der in der Literatur mitgeteilten Werte, ist schwierig, denn die angegebenen Verteilungskoeffizienten wurden unter verschiedenen Bedingungen ermittelt. Da der verwendete Puffer (le Petit 1980; Wang und Lien 1980), die Pharmakonkonzentration und die Temperatur (Kubinyi 1979) Einfluß auf den Verteilungskoeffizienten haben können, sind für ein und dasselbe Pharmakon unterschiedliche Verteilungskoeffizienten zu finden. Aus diesem Grund wurde die Bestimmung der Verteilungskoeffizienten unter vergleichbaren Bedingungen in eigenen Versuchen durchgeführt. Als Lipidphasen wurden Oktanol (polar), Heptan (unpolar) und extrahiertes Hautfett (physiologisch) verwendet.

Durch die unterschiedlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften der Lipidphasen werden die lipophilen Eigenschaften der Pharmaka differenziert. Der Oktanol-Verteilungskoeffizient ist ein geeignetes Maß zur Beschreibung der Lipophilie von Pharmaka und ihrer Bindung an Proteine und Gewebe (Leo et al. 1971). Der Heptan-Verteilungskoeffizient eignet sich dagegen besser, um den Zusammenhang zwischen der Lipophilie von Pharmaka und deren Permeation durch Membranen zu beschreiben (Appiah 1971).

Der Zusammenhang zwischen der Bindung der Pharmaka an die Epidermis und ihrer Lipophilie wird von den drei Verteilungskoeffizienten unterschiedlich gut beschrieben. Für den Heptan-Verteilungskoeffizienten ist für diese Beziehung der Zusammenhang schwach signifikant ($r = 0,73$; $p < 0,05$). Besser wird die Pharmakonbindung an die Epidermis durch den Oktanol- und Hautfett-Verteilungskoeffizienten beschrieben (für beide $r = 0,81$; $p < 0,01$).

Für das Corium läßt sich ebenfalls ein Zusammenhang zwischen der Pharmakonbindung und der Lipid-

löslichkeit finden. Hier wird die Bindung aber besser mit dem Heptan- ($r = 0,81$; $p < 0,01$) bzw. Oktanol-Verteilungskoeffizienten ($r = 0,77$; $p < 0,01$) beschrieben. Für den Hautfett-Verteilungskoeffizienten läßt sich dagegen nur eine schwach signifikante Korrelation berechnen ($r = 0,74$; $p < 0,05$).

Bei der Messung der Verteilungskoeffizienten bei pH 7,0 sind die Pharmaka unterschiedlich stark ionisiert. Diazepam ist bei pH 7,0 nahezu nicht-ionisiert, wogegen Isotretinoin, Salicylsäure, Propranolol und Imipramin fast vollständig dissoziiert sind. Wenn die lipophilen Eigenschaften der Pharmaka für die Bindung an die Hautschichten verantwortlich sind, ist der Verteilungskoeffizient der nicht-ionisierten Substanz ein besseres Maß zur Beurteilung des Zusammenhangs zwischen Lipophilie der Pharmaka und deren Bindung an die Haut. Der Verteilungskoeffizient der nicht-ionisierten Substanz (VK^*) läßt sich aus dem Verteilungskoeffizienten bei pH 7,0 wie folgt berechnen:

$$VK^* = F \cdot VK_{7,0} \quad (Gl. 4)$$

Die Korrektur mit dem Faktor F ergibt sich aus der Hendersson-Hasselbalch'schen Gleichung:

$$F_S = 1 + 10^{pH - pK_a} \quad (\text{für Säuren})$$

$$F_B = 1 + 10^{pK_a - pH} \quad (\text{für Basen})$$

Mit dem Oktanol-Verteilungskoeffizienten der nicht-ionisierten Substanz läßt sich der Zusammenhang zwischen der Bindung an die Hautschichten und der Lipophilie der Pharmaka am besten beschreiben (Abb. 7a und 7b). So läßt sich

für die Epidermis ein Korrelationskoeffizient $r = 0,86$ und für das Corium $r = 0,84$ berechnen ($p < 0,01$).

Aus diesen Korrelationskoeffizienten lassen sich

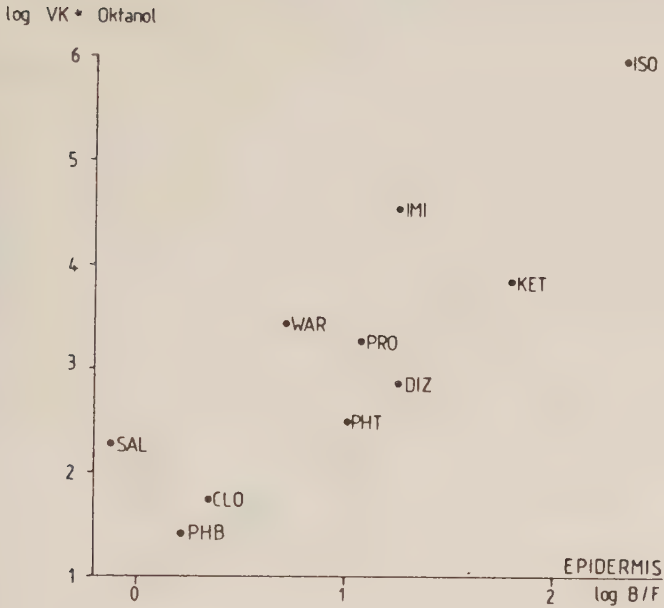


Abb. 7a:

Zusammenhang zwischen der Bindung an die Epidermis und dem Oktanol-Verteilungskoeffizienten für die nicht-ionisierte Substanz (VK*).

$$r = 0,86; \quad p < 0,01$$

$$\log B/F_{\text{Epidermis}} = 0,46 \cdot \log VK^* - 0,49$$

mit dem Bestimmtheitsmaß (r^2) 73 % der Epidermisbindung und 71 % der Coriumbindung durch die lipophilen Eigenschaften der Pharmaka erklären.

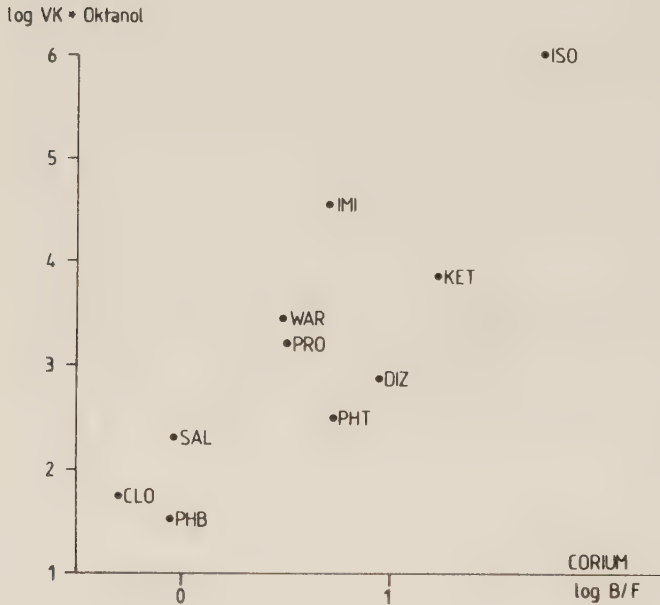


Abb. 7b:

Zusammenhang zwischen der Bindung an das Corium und dem Oktanol-Verteilungskoeffizienten für die nicht-ionisierte Substanz (VK*).

$$r = 0,84; \quad p < 0,01$$

$$\log B/F_{\text{Corium}} = 0,38 \cdot \log VK^* - 0,64$$

3.4.1. Vergleich der drei verwendeten Lipidphasen:

Im Gegensatz zu Heptan und Oktanol ist das extrahierte Hautfett keine chemisch einheitliche Lipidphase.

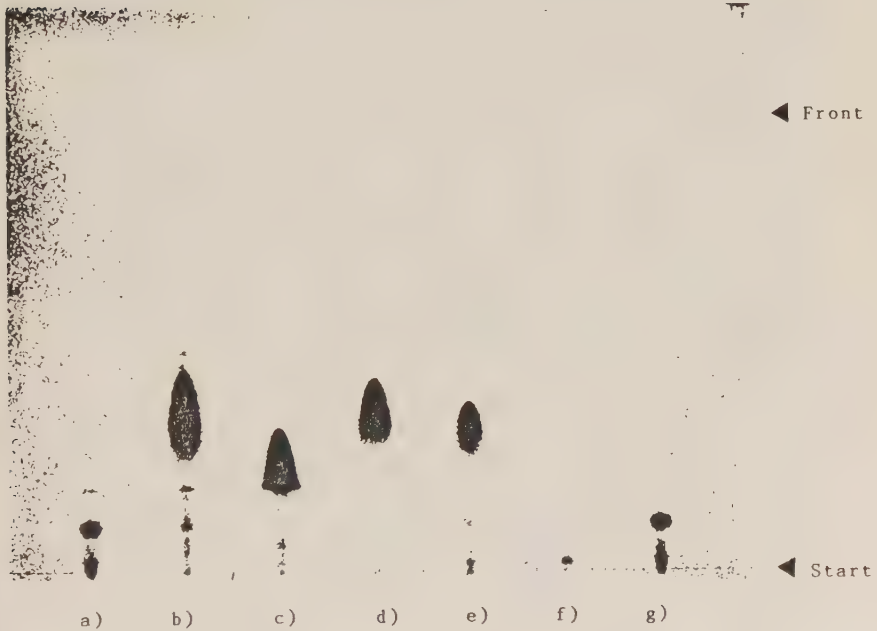


Abb. 8:

Dünnschichtchromatographie des extrahierten Hautfetts mit Vergleichssubstanzen.

a) Cholesterin (0,2) b) Hautfett (0,3); c) Linolsäure (0,2);
 d) Triolein (0,2); e) Hautfett (0,1); f) Dimyristoyl-
 phosphatidcholin (0,1); g) Sitosterin (0,2);

Laufmittel: Petrolether : Diethylether : Eisessig (90:10:1)

Detektion: Molybdatphosphorsäure

() = aufgetragene Menge in mg

Um einen Überblick über die qualitative Zusammensetzung des extrahierten Hautfetts zu bekommen, wurde es dünn-schichtchromatographisch untersucht.

In Abbildung 8 ist zu sehen, daß das Hautfett aus mehreren Komponenten besteht. Dabei sind neben Triglyceriden (Vergleich: Triolein), Fettsäuren (Vergleich: Linolsäure) und Lipide vom Steroltyp (Vergleich: Cholesterin und Sitosterin) zu erkennen. Auch wenn sich keine quantitativen Aussagen machen lassen, läßt sich dennoch auf Grund der Fleckengröße abschätzen, daß ein großer Anteil des Hautlipidextraktes aus Triglyceriden besteht. Diese Vermutung steht in Einklang mit den Befunden von Wilkinson und Karasek (1966). Sie fanden, daß die aus Mäusehaut extrahierten Gesamtlipide zu 98 % aus Triglyceriden bestehen und sich die restlichen 2 % auf die übrigen Lipidfraktionen verteilen. In diesem Zusammenhang läßt sich auch der geringe Phospholipidgehalt (0,6 %) in unserem Lipidextrakt erklären.

Vergleicht man die Verteilungskoeffizienten der drei verwendeten Lipidphasen untereinander, fällt auf, daß ein besserer Zusammenhang zwischen dem Oktanol- und dem Hautfett-Verteilungskoeffizienten besteht ($r = 0,9$; $p < 0,001$) als zwischen dem Heptan- und dem Hautfett-Verteilungskoeffizienten ($r = 0,78$; $p < 0,01$). Durch die enthaltenen Triglyceride ist das Lipidgemisch dem polaren, sauerstoffhaltigen Oktanol ähnlicher als dem unpolaren Heptan. Dieses Ergebnis entspricht den Befunden von Appiah (1971), der die Verteilungskoeffizienten aus extrahiertem Körperfett, Oktanol und Heptan untereinander verglich. Da Körperfett auch zum Großteil aus Triglyceriden besteht, fand er einen besseren Zusammenhang mit dem Oktanol- als mit dem Heptan-Verteilungskoeffizienten.

4. Bindung von Pharmaka an entfettete Epidermis- und Coriumproben:

In 3.4. wurde gezeigt, daß die Lipophilie der Pharmaka erheblichen Anteil an der Bindung an Epidermis und Corium hat. Da der Oktanol-Verteilungskoeffizient ein geeignetes Maß ist, sowohl die Gewebefindung bzw. Proteinbindung von Pharmaka, als auch ihre Verteilung in physiologische Lipide (siehe 3.4.1.) zu beschreiben, kann mit ihm nicht differenziert werden, welche der beiden Möglichkeiten als Bindung an die Hautschichten ermittelt wurde. Daß die Gewebelipide für einige Pharmaka Einfluß auf das Ausmaß der Bindung haben können, wurde in 3.3.1. gezeigt. Um die Bedeutung der Gewebelipide am Ausmaß der Bindung von Pharmaka an Epidermis und Corium abzuklären, wurden die Proben vor den Bindungsversuchen entfettet. Da die Bindung lipophiler Pharmaka am auffälligsten durch die Gewebelipide beeinflußt wird, wurden die Versuche mit Phenytoin, Isotretinoin, Ketoconazol und Diazepam durchgeführt.

Die Gewebelipide wurden durch Extraktion der Proben mit Hexan entfernt. Hexan ist ein unpolares Extraktionsmittel, das gegenüber polareren Lösungsmitteln den Vorteil hat, das Gewebe bei der Extraktion zu schonen (Schmid und Chelf 1976). Durch diesen vergleichsweise geringen Einfluß auf das Gewebe durch die Lipidextraktion, kann davon ausgegangen werden, daß die Proteine nicht wesentlich in ihren Bindungseigenschaften verändert werden. Da aber Hexan als unpolares Lösungsmittel polare Lipide schlecht löst (Schmid und Hunter 1971), wurden für Ketoconazol und Diazepam vergleichende Versuche mit einem polaren Lösungsmittelgemisch (Chloroform-Methanol 2:1 V/V) durchgeführt.

Die Extraktion der Gewebelipide beeinflusste die Bindung der Pharmaka an die zwei Hautschichten unterschiedlich (Abb. 9a und 9b). Für die Bindung von Isotretinoin und Phenytoin an die Epidermis war kein signifikanter Einfluß festzustellen. Die Epidermisbindung von Ketoconazol stieg dagegen nach der Entfettung mit den beiden Lösungsmitteln schwach an.

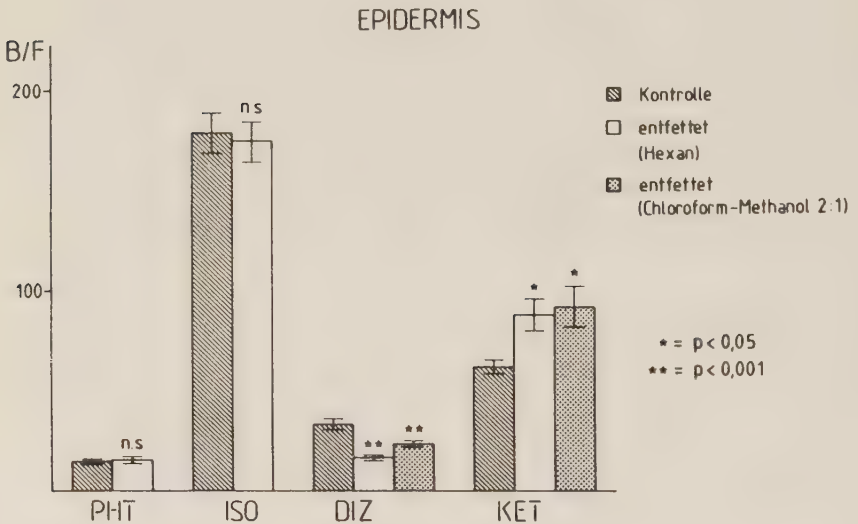


Abb. 9a:

Vergleich der Bindung von Pharmaka an unbehandelte und entfettete Epidermis; die Bindung ist als gebundener zu freiem Anteil (B/F) dargestellt. ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$; $n=3$)

PHT = Phenytoin; ISO = Isotretinoin;

DIZ = Diazepam; KET = Ketoconazol;

Für Diazepam änderte sich die Bindung am auffälligsten. Nach der Entfettung mit beiden Lösungsmitteln war eine signifikante Abnahme der Bindung zu bemerken. Im Vergleich zu den unbehandelten Proben verringerten sich die B/F-Werte etwa um die Hälfte. Nach der Hexan-Extraktion war eine niedrigere Bindung als nach der Chloroform-Methanol-Extraktion festzustellen.

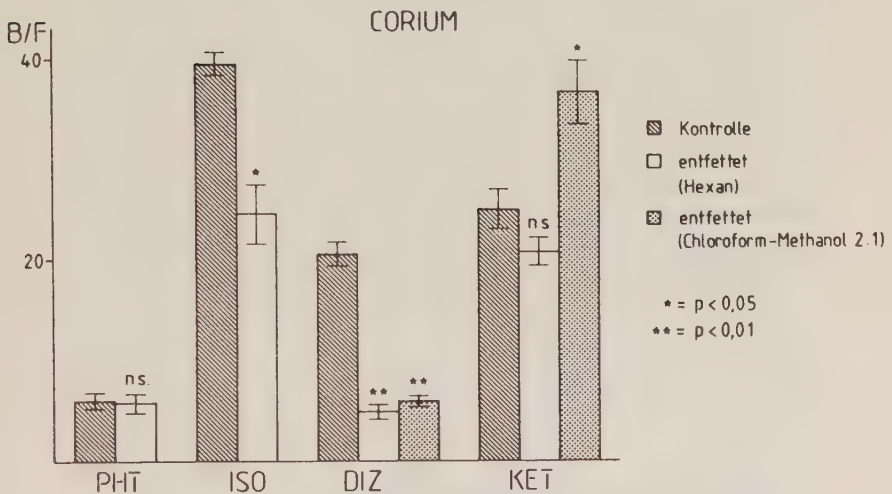


Abb. 9b:

Vergleich der Bindung von Pharmaka an unbehandeltes und entfettetes Corium; die Bindung ist als gebundener zu freiem Anteil (B/F) dargestellt. ($\bar{x} \pm s_x$; $n=3-6$)

PHT = Phenytoin;

ISO = Isotretinoin;

DIZ = Diazepam;

KET = Ketoconazol;

Die Entfettung des Coriums erbrachte ähnliche Ergebnisse. Die Bindung von Phenytoin wurde auch hier nicht beeinflusst, wogegen bei Isotretinoin eine Abnahme der Bindung zu finden war. Für Ketoconazol war beim Corium nur nach Entfettung mit dem polaren Lösungsmittel ein Anstieg festzustellen. Auch für das Corium war bei Diazepam die Änderung der Bindung am auffälligsten. Hier war für das extrahierte Corium eine Verringerung der Bindung bis zum 4-fachen des B/F-Wertes festzustellen (Tab. 5 Anhang).

Der Wassergehalt der Proben der drei untersuchten Gruppen (Kontrollen, Hexan- bzw. Chloroform-Methanol-entfettetes Gewebe) war unterschiedlich. So hatten nach der Inkubation die entfetteten Proben einen höheren Wasseranteil als die Kontrollen. Allerdings konnten auch Unterschiede im Wassergehalt zwischen den mit Lösungsmittel behandelten Gruppen festgestellt werden (siehe 4.1.). Deshalb wurde die Bindung statt nur für das Feuchtgewicht (B/F) auch für das Trockengewicht berechnet (B'/F ; Definition siehe 2.1.). Diese Art der Berechnung der Bindung bestätigte die oben genannten Resultate und zeigte, daß der Unterschied im Wassergehalt der Proben keinen relevanten Einfluß auf die Ergebnisse hatte.

4.1. Vergleich der zwei Extraktionsmittel:

Die zwei verwendeten Lösungsmittel unterscheiden sich durch ihre polaren bzw. unpolaren Eigenschaften. Das unpolare Hexan gewährleistet für das Gewebe eine relativ schonende Lipidextraktion, ist aber nur für Neutrallipide ein gutes Lösungsmittel. Das Chloroform-Methanol-Gemisch löst dagegen nahezu vollständig die Gewebelipide (Schmid 1973), schädigt aber dafür das Gewebe bei der Extraktion (Schmid und Chelf 1976) und kann

dadurch möglicherweise die Bindungseigenschaften des Gewebes verändern.

Um die Ausbeute an Lipiden beider Extraktionsmittel zu vergleichen, wurde die extrahierte Lipidmenge bestimmt. Mit dem Chloroform-Methanol-Gemisch wurde aus beiden Hautschichten das 1,9-fache der Lipide der Hexan-Extraktion erhalten. Schmid und Chelf (1976) fanden bei einem Vergleich dieser zwei Lösungsmittel dasselbe Verhältnis der Lipidmengen bei der quantitativen Bestimmung der Hautoberflächenlipide beim Menschen.

Ob das Gewebe durch die Lipidextraktion geschädigt wurde, konnte nicht überprüft werden. Allerdings war nach der Chloroform-Methanol-Extraktion des Coriums makroskopisch eine Veränderung der Konsistenz des Gewebes im Vergleich zum Hexan-behandelten Corium zu sehen. Dieser mögliche Einfluß des polaren Lösungsmittels zeigte sich auch durch ein verringertes Quellvermögen des Gewebes. Verglichen mit dem Hexan-behandelten Corium war der Wassergehalt des Gewebes signifikant erniedrigt ($p < 0,001$).

C. DISKUSSION

1. Kritik der Methodik:

1.1. Präparation der Hautschichten:

1.1.1. Epidermis:

Für die Trennung der Epidermis vom Corium werden in der Literatur mehrere Möglichkeiten beschrieben. Die Anwendung von Chemikalien (Stüttgen und Schäfer 1974; Di Giovanna et al. 1985) und die Trennung durch Hitzeeinwirkung (Baumberger et al. 1942) erschien ungünstig für unsere Versuche, da eine Veränderung bindender Proteine nicht ausgeschlossen werden kann. Die Trennung der Hautschichten durch Strecken der Haut (van Scott 1952) verlangt manuelles Geschick und hat den Nachteil, daß nicht alle Schichten der Epidermis vollständig abgelöst werden. Trotz des zeitlichen und apparativen Aufwandes erschien uns die Saugblasenmethode von Kiistala (1968) am geeignetsten zur Präparation der Epidermis. Die Vergrößerung eines vertikalen Schnittes durch die Haut zeigt, daß sich eine subepidermale Blase ausgebildet hat und daß das Gewebe bzw. die Gefäße durch den Unterdruck von -300 mm Hg nicht geschädigt wurden (Abb. 10a und 10b).

Bei der Trennung von Epidermis und Corium wird dem Corium Flüssigkeit entzogen. Diese Blasenflüssigkeit hatte eine Proteinkonzentration von 2,15 g/100 ml. Dieser Wert entspricht den Literaturangaben, die für die Blasenflüssigkeit in vivo 25-30 % der Proteinkonzentration des Plasmas angeben (Vermeer et al. 1979; Volden et al. 1980). Da das Volumen der Blasenflüssigkeit ca. 500 µl hatte, läßt sich abschätzen, daß dem Gewebe ca. 10 mg Protein

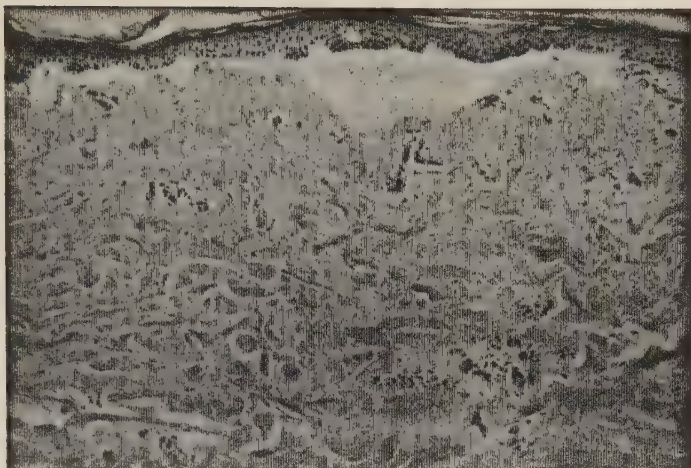


Abb. 10a:

Vergrößerung einer Hautprobe mit subepidermaler Blase (x 120).

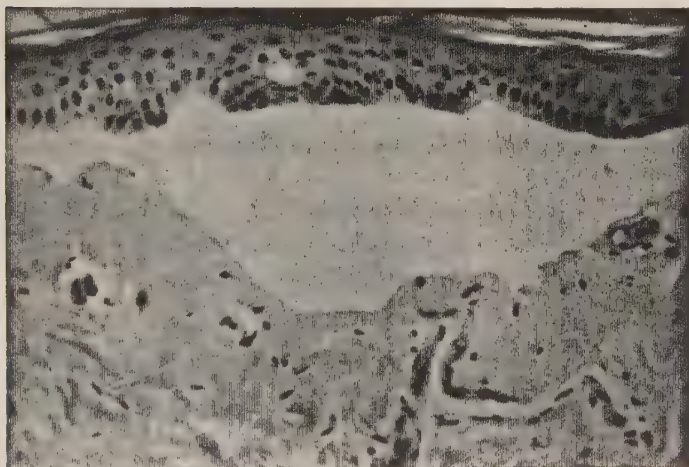


Abb. 10b:

Vergrößerung der Blase aus Abb. 10a (x 480).

entzogen wurden. Unter der Voraussetzung, daß die Proteine aus dem gesamten Gewebe stammten, läßt sich errechnen, daß dieser Verlust nur etwa 1 % des Gesamtprotein-gehaltes ausmacht*. So ließ sich auch für Ketoconazol, einem Pharmakon mit hoher Plasmabindung, kein Einfluß auf die Coriumbindung durch diese entzogenen Proteine feststellen.

1.1.2. Corium:

Die Gewinnung des Coriumanteils durch horizontales Schneiden mit dem Gefrieremikrotom ist eine in der Literatur häufig beschriebene, unproblematische Methode (Menczel und Maibach 1972; Tajima et al. 1982; Menczel et al. 1983, 1984; Di Giovanna et al. 1985). In Abbildung 10c ist ein histologischer Schnitt durch die benutzte Coriumfraktion von 0,2 mm Dicke zu sehen.

Ein paralleler Schnitt durch das Corium in 0,2 mm Tiefe wurde aus folgenden Gründen gewählt:

- a) Die Dicke des Coriums variiert interindividuell. Bei der gewählten Schnittiefe kann man davon ausgehen, daß nur Corium und nicht auch subcutanes Fettgewebe gewonnen wird. Diese Voraussetzung ist

*

Die verwendeten Hautstücke hatten ein Gewicht von ca. 4g. Bei einem Wassergehalt von 70 % läßt sich ein Trockengewicht von 1,2 g errechnen. Von dem Trockengewicht entfallen 30 % auf den Anteil der Lipide und anderer Bestandteile. So läßt sich für den Proteinanteil des gesamten Gewebestückes 0,84 g errechnen.

notwendig, da bei der großen Anzahl verwendeter Hautproben eine histologische Kontrolle nur in Stichproben möglich war.

b) Ein Gewebestück von 0,2 mm Dicke gewährleistet, daß sich schnell ein Gleichgewicht zwischen Gewebe und Inkubationsmedium einstellt.

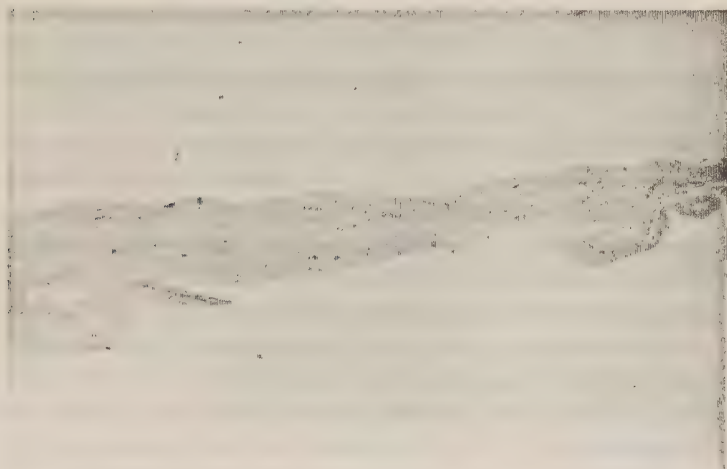


Abb. 10c:

Vergrößerung einer mit dem Gefriermikrotom geschnittenen Coriumscheibe (x 60).

Zudem zeigte sich, daß der oberste Coriumanteil durch die mechanische Belastung in der rotierenden Dialyse- zelle nicht so zerfasert wie das Corium aus tieferen Schichten.

Da wir nur die oberste Schicht des Coriums un- tersuchten, stellt sich die Frage, ob die ermittelten

Bindungswerte für das gesamte Corium repräsentativ sind. Deshalb wurden für Isotretinoin, Ketoconazol und Diazepam, den Pharmaka mit der höchsten Coriumbindung, zusätzlich Versuche mit Coriumschnitten aus 0,4 mm und 0,6 mm Tiefe der selben Hautprobe durchgeführt (Tab. 6 Anhang).

Für die drei Pharmaka kann die Bindung in tieferen Coriumschichten etwas niedriger sein. Für Ketoconazol war die Bindung an Corium aus den drei Schnittiefen gleich. Für Diazepam war die Bindung an die 0,6 mm Schicht etwas erniedrigt ($p < 0,05$). Für Isotretinoin war der Unterschied in der Bindung an die drei Schichten am auffälligsten. Der B/F-Wert der 0,2 mm Schicht lag um das 3,8-fache höher als bei den anderen zwei Schichten ($p < 0,01$). Diese teilweise erniedrigte Bindung an Proben aus tieferen Coriumschichten ist möglicherweise durch den geringeren Anteil an Kollagen und Glykosaminoglykanen in diesem Teil des Coriums bedingt (Tajima et al. 1982). Menczel et al. (1983, 1984) fanden dagegen für Lindan und Malathion keine unterschiedliche Bindung bis 1,2 mm tiefe Coriumschichten.

An dieser Stelle soll auch auf die unterschiedliche Bindung von Isotretinoin und Ketoconazol an Coriumproben von unterschiedlichen Körperstellen eingegangen werden (siehe B.3.3.4.). Die entnommenen Hautproben (Oberschenkel-, Rücken-, Bauchhaut) variierten in der Coriumdicke. Das bedeutet, daß mit 0,2 mm dicken Scheiben nicht vergleichbare Anteile des Coriums gewonnen wurden. Außerdem kann diese unterschiedliche Bindung auch durch intraindividuelle Unterschiede erklärt werden, da im Gegensatz zur Bauch- und Rückenhaut die Oberschenkelhaut stark behaart war. So können Teile von Haarfollikeln und Talgdrüsen die Bindung beeinflussen,

da Ketoconazol in vitro eine hohe Affinität für das Sebum hat (Harris et al. 1983) und Isotretinoin spezifisch an Talgdrüsen gebunden werden kann (Puhvel und Sakamoto 1984).

1.2. Die Versuchsbedingungen:

1.2.1. Wahl der Inkubationstemperatur:

Die Versuche wurden bei einer Temperatur von 4 °C durchgeführt. In der Literatur wird für die gesunde Haut eine Außentemperatur von durchschnittlich 32,2 °C angegeben (Nyfors und Rothenborg 1970). Die Inkubationstemperatur wurde so niedrig gewählt, um eine Veränderung der Pharmaka zu vermeiden. Durch diese Temperaturdifferenz könnte die Bindung gegenüber in vivo Bedingungen verändert sein.

Den Ergebnissen anderer Autoren zufolge, hat jedoch die Temperatur für die Pharmakonbindung an Gewebe nur geringen Einfluß (Wosilait 1968; Balzer et al. 1968; Dollery und Junod 1976; Fichtl 1983).

1.2.2. pH-Wert der Inkubationslösung:

Die Versuche mit Epidermis und Corium wurden bei einem pH-Wert von 7,0 durchgeführt. Wie erwähnt (B.3.2.), wurde dieser Wert gewählt, da im Extrazellulärraum der Haut kein einheitlicher pH-Wert herrscht (Szakall 1951). Aus diesem Grund sind auch bei Untersuchungen anderer Autoren mit Epidermis und Corium sehr unterschiedliche pH-Werte für die Inkubationsflüssigkeit zu finden. Sie

reichen von pH 5,5 (Menczel und Maibach 1972) bis pH 7,4 (Hsia et al. 1970).

Während pH 7,0 den physiologischen Bedingungen der Epidermis entspricht (Marples 1965), ist er für das Corium etwas zu niedrig. Welchen pH-Wert das Corium in vivo hat, ist allerdings nicht eindeutig geklärt. In der Literatur sind Hinweise zu finden, daß der pH-Wert im Gewebe unter dem des arteriellen Blutes liegt (Dunn et al. 1978). Wolpert et al. (1970) fanden in der Extrazellulärflüssigkeit des Hundemuskels einen pH-Wert von 7,1 bis 7,2. Sturbois et al. (1977) fanden bei Neugeborenen, daß der intracutan gemessene Gewebe-pH-Wert etwa um 0,12 Einheiten unter dem des Blutes liegt.

Die Bedenken wegen einer möglicherweise nicht physiologischen Wahl des pH-Wertes bei den Versuchen verlieren jedoch an Bedeutung, da wir zwischen pH 6,4 und pH 7,6 keine wesentliche Änderung der Bindung beobachten konnten.

1.2.3. Dialyse:

Die Inkubation der Gewebestücke bei gleichzeitiger Dialyse wurde notwendig, da aus Epidermis und Corium während der Inkubation lösliche Proteine ausgeschwemmt werden (Prochazka Fisher 1965; Pasricha und Kandhari 1970 a und b) sowie durch die mechanische Belastung Gewebe abschilfert. Aus diesem Grunde wurden bei anderen in vitro Bindungsversuchen mit Epidermis und Corium ebenfalls die freie Pharmakonkonzentration durch Dialyse bestimmt (Menczel und Maibach 1972; Artuc et al. 1979, 1980; Menczel et al. 1983, 1984).

Mit der Gleichgewichtsdialyse lassen sich die

exaktesten Ergebnisse bei der Proteinbindung erzielen (Kurz et al. 1977; Scholtan 1978). In diesen Arbeiten wird auch immer wieder auf mögliche Fehlerquellen hingewiesen, die berücksichtigt werden müssen.

a) Adsorption des Pharmakons an die Dialysemembran:

Die Adsorption von Pharmaka an die Dialysemembran kann durch elektrostatische Wechselwirkungen zustande kommen. Für regenerierte Cellulose, aus der unsere Dialysemembranen bestehen, zeigten Craig und Ansevin (1963), daß sie nahezu ungeladen ist. Für besonders lipophile Pharmaka ist bekannt, daß sie in großem Ausmaß an die Membran gebunden werden können. Diese Beobachtung machten wir auch für die sehr lipophilen Pharmaka Isotretinoin und Ketoconazol. Interessanterweise betrug die Membranbindung im gewebefreien Ansatz bis zu 50 %, während im Ansatz mit dem Gewebe nur 20 % Membranbindung zu messen war. In unseren Versuchen kann eine Verfälschung der Ergebnisse durch die Membranadsorption ausgeschlossen werden, da die Pharmakonzentration direkt im Gewebe und auf der Pufferseite der Dialysezelle gemessen wurde. Die Konzentrationsänderung durch die Membranbindung und die Verdünnung bei der Dialyse ist vernachlässigbar, da die Bindung an die zwei Hautschichten weitgehend konzentrationsunabhängig ist.

b) Donnan-Effekt:

Bei der Dialyse von Kolloidelektrolyten kann es durch unterschiedliche Ladungsverteilung zu einem Konzentrationsunterschied der freien Pharmakonzentration in den Hälften der Dialysekammer kommen. Auf Grund der Erfahrung, daß bei der Dialyse der Plasmaproteine nur in geringem Ausmaß mit einer Beeinflussung durch den

Donnan-Effekt zu rechnen ist, läßt sich dies ebenfalls für unsere Versuche annehmen. Dies liegt in der Tatsache begründet, daß die Plasmaproteine (6 g/100 ml) 100-fach höher in der proteinhaltigen Kammerhälfte konzentriert sind, als die von uns gemessene durchschnittliche Proteinkonzentration (64 mg/100 ml).

c) Blockade der Membranpassage:

Durch die geringe Konzentration löslicher Proteine auf der Inkubationsseite ist eine Beeinflussung der Membranpassage auszuschließen. Dies wird auch durch Versuche belegt, bei denen Pharmakon- bzw. Pufferlösung in die jeweils andere Kammerhälfte eingefüllt wurde. Für die Bindung war es unerheblich, auf welcher Seite der Dialysekammer sich die jeweiligen Lösungen bei Versuchsbeginn befanden.

d) Volumeneffekt durch das Gewebestück:

Bei einer durchschnittlichen Einwaage von ca. 25 mg auf 1,8 ml Pharmakonlösung nimmt das Gewebestück nur ca. 1% des Volumens ein. Bei der Berechnung ist berücksichtigt, daß das Gewebe eine andere Dichte hat als die Lösung. Durch den geringen Volumenanteil des Gewebestückes ist kein Volumeneffekt zu erwarten.

1.2.4. Einfluß des Gefrierens:

Da die Hautproben nur in unregelmäßigen Abständen entnommen werden konnten, mußten sie bis zu den Versuchen eingefroren werden. Ebenso wurde das Corium beim Schneiden mit dem Gefrieremikrotom gefroren. In Vorversuchen wurde für Phenobarbital und Imipramin gezeigt, daß das

Einfrieren die Bindung an die Epidermis bzw. das Corium nicht verändert. Kapoor et al. (1973) fanden bei der Bindung von Bilirubin an die Epidermis ebenfalls keinen Einfluß durch vorheriges Gefrieren der Proben. Auch für die Penetration von Pharmaka durch die Haut wurde kein Einfluß durch das Einfrieren gefunden (Zesch 1982; Loth und Hailer 1983).

1.3. Berechnung der Bindung:

1.3.1. Konzentration des Pharmakons im Gewebewasser:

Zur Berechnung der Pharmakonbindung wurde der Wassergehalt des Gewebes berücksichtigt (Gl. 8). Voraussetzung für die Berechnung ist, daß nach Einstellung des Gleichgewichtes das gesamte Gewebewasser als Lösungsmittel für die Pharmaka zur Verfügung steht. Diese theoretische Grundlage wird aus Arbeiten abgeleitet, die zeigten, daß im Gewebe, Blut und anderen Kolloidsystemen das gesamte Wasser als Lösungsmittel für niedermolekulare Substanzen zur Verfügung steht (Hill 1930; Greenberg und Greenberg 1933).

1.3.2. Konzentration des Pharmakons im Gewebe:

Zur Berechnung der Bindung wurde die Gesamtkonzentration des Pharmakons im Gewebe ermittelt. Da die eingesetzten Proben während der Inkubation an Gewicht verloren (lösliche Bestandteile und abgeschilfertes Gewebe), mußte dieser Gewichtsverlust bei der Berechnung berücksichtigt werden. Aus diesem Grunde wurde die Gesamtkonzentration

der Pharmaka im Gewebe statt mit dem Gewicht der Einwage mit dem Feucht- bzw. Trockengewicht nach der Inkubation berechnet.

Überprüfende Berechnungen zeigten, daß die so ermittelten Bindungswerte durch die an nicht berücksichtigte Gewebebestandteile gebundene Pharmakomengen nur unwesentlich beeinflußt werden.

1.4. Metabolismus:

Die Haut ist in der Lage Pharmaka zu metabolisieren (Pannatier et al. 1978; Kitano et al. 1982; Merk 1985). Verglichen mit der Leber beträgt die Metabolisierungsrate der Haut in vivo nur etwa 0,8 % (Täuber 1982). Bei direktem Kontakt des Pharmakons mit der Haut, wie in unseren Versuchen, kann ein Pharmakon aber bis zu 50 % metabolisiert werden (Täuber und Toda 1976). Für die Versuche mit der Epidermis besteht neben einer Metabolisierung durch das Gewebe auch die Möglichkeit der Veränderung des Pharmakons durch die natürlich vorhandene Bakterienflora.

Für die Pharmaka Diazepam, Imipramin, Ketoconazol und Phenobarbital wurde nach dem Versuchsende überprüft, ob durch die Epidermis und das Corium Arzneistoffe eventuell verändert werden. Alle untersuchten Pharmaka blieben über die gesamte Versuchsdauer unverändert. Deshalb kann davon ausgegangen werden, daß die durch Szintillationszählung ermittelten Pharmakonzentrationen im Gewebe und auf der Pufferseite der Dialysekammer nur die eingesetzten Substanzen enthielten.

1.5. Bestimmung des Gesamtlipidgehaltes:

Während die Bestimmung des Stickstoffgehaltes der Gewebeproben eine leicht durchzuführende Methode darstellt, ist die Bestimmung des Gesamtlipidgehaltes der Epidermis und des Coriums problematischer.

Die Extraktion mit dem Chloroform-Methanol-Gemisch ist vollständig (siehe D.5.) und extrahiert auch ohne Homogenisieren der Proben Lipide aus tieferen Gewebeschichten (Nicolaidis 1963). Die gravimetrische Bestimmung der extrahierten Lipide ist durch die geringen Gewebemengen, die zur Verfügung standen, zu ungenau. Deshalb wurde die Gesamtlipidbestimmung mit der Sulfo-Phospho-Vanillin-(SPV) Reaktion durchgeführt. Als problematisch wird die Bestimmung eines Lipidgemisches aus dem Gewebe angesehen, da die einzelnen Komponenten unterschiedliche Extinktionskoeffizienten haben können (Saifer und Feldman 1971; Donhoffer 1974).

Für die Bestimmung des Lipidextraktes der Proben wurde ein Standard zur Bestimmung des Plasmalipidgehaltes herangezogen (siehe D.5.). Eine Überprüfung der Ergebnisse mit einer Eichgeraden, die mit extrahiertem Hautfett erstellt wurde, bestätigte die mit dem Standard ermittelten Resultate.

2. Diskussion der Ergebnisse:

2.1. Bindung an Epidermis und Corium:

Wie eingangs erwähnt, existieren keine ausführlichen Arbeiten, die die Pharmakonbindung an Epidermis und Corium untersucht haben. Die Ergebnisse der schon vorhandenen

Arbeiten zeigen aber, daß an die Hautschichten ebenfalls Pharmaka bzw. Stoffe in unterschiedlichem Ausmaß gebunden werden. Die ermittelte Bindung variiert zwischen 0 % (Theophyllin in der Epidermis) und über 90 % (Lindan in beiden Hautschichten).

Eine höhere Bindung an die Epidermis bzw. epidermishaltige Schnitte im Vergleich zum Corium, läßt sich in den Arbeiten, die Epidermis und Corium untersuchten, allerdings nicht finden. Dies kann auf zwei Gründe zurückzuführen sein:

a) Es ist keine klare Trennung zwischen Epidermis und Corium möglich, da die Gewebeproben mit einem Gefriermikrotom geschnitten wurden.

b) Teilweise liegen die Mittelwerte der epidermishaltigen Schicht über denen der reinen Corium-schnitte. Durch die großen Standardabweichungen, die in den Arbeiten angegeben sind, lassen sich aber keine signifikanten Unterschiede erkennen.

Für Benzylalkohol wurden Epidermis und Corium getrennt untersucht (Menczel und Maibach 1972). Hier läßt sich durch die klare Trennung der beiden Hautschichten eine signifikant höhere Bindung an die Epidermis finden. Auch Tormä und Vahlquist (1984) fanden für Retinol in vitro eine signifikant höhere Bindung an die Epidermis als an das Corium. Für diesen Unterschied in der Bindung werden in der Epidermis vorkommende spezifisch bindende Proteine verantwortlich gemacht (Siegenthaler et al. 1984; Di Giovanna et al. 1985).

Mit der Bindung von Pharmaka an die beiden Hautschichten stellt sich die Frage, an welche Bestandteile

der Gewebe die Pharmaka gebunden werden. Eine Reihe von Untersuchungen zeigen, daß die Pharmakonbindung an in den Hautschichten vorkommende Strukturen spezifisch und unspezifisch sein kann. Diese Untersuchungen wurden mit isolierten Komponenten durchgeführt und zeigen die vielfältigen Möglichkeiten an die ein Pharmakon in der Haut gebunden werden kann. Die folgende Aufzählung soll einen Überblick über die Bindung von Pharmaka an die Strukturen von Epidermis und Corium geben:

- Melanin (Sams und Epstein 1965; Blois 1968; Blois und Taskovich 1969; Adams et al. 1974; Lundquist und Ullberg 1974)
- Keratin (Freedman et al. 1962)
- Keratinocyten und Fibroblasten (Ponec und Kempenaar 1983)
- Kollagen (Eik-Nes et al. 1954)
- Glykosaminoglykane (West et al. 1977; Deguchi et al. 1978)
- Rezeptoren (Adachi 1974; Slaga et al. 1977; Verbruggen und Salomon 1980; Hughes und Yardley 1982)
- Lipide (Seydel und Wassermann 1976; Lüllmann und Wehling 1979; Surewicz und Leyko 1982)

Die große Anzahl möglicher Strukturen, an die ein Pharmakon in den beiden Hautschichten gebunden werden kann, zeigt, daß für die Epidermis und das Corium eine Charakterisierung der Bindung nicht möglich ist. Auch unter der Berücksichtigung, daß auf Grund der Anzahl der untersuchten Pharmaka keine allgemeingültige Aussage möglich ist, lassen sich dennoch in den Ergebnissen der Untersuchungen Hinweise finden.

Die geringe Abhängigkeit der Bindung von der Pharmakon-

konzentration und vom pH-Wert des Inkubationsmediums sowie die signifikante Korrelation zwischen Bindung und Lipophilie der Pharmaka weisen auf eine unspezifische Bindung an die Haut hin. Ferner läßt sich erkennen, daß die Bindung einiger Pharmaka vom Gesamtlipid- und Proteingehalt des Gewebes abhängen kann. Durch die Gewebelipide wird die Bindung an beide Hautschichten nur in geringem Ausmaß beeinflußt. Die Pharmaka werden demnach an andere Gewebebestandteile z.B. Proteine gebunden.

2.2. Konzentrationsabhängigkeit der Bindung:

Für den Großteil der untersuchten Pharmaka war keine Abhängigkeit der Bindung in der Epidermis und im Corium von der Pharmakonzentration zu finden. Auch bei den Beispielen, bei denen eine statistisch feststellbare Konzentrationsabhängigkeit gefunden wurde, kann in Anbetracht des großen Konzentrationsbereiches in dem gemessen wurde, die Bindung als weitgehend konzentrationsunabhängig angesehen werden. Die beiden Gewebe haben offensichtlich eine große Bindungskapazität, die über den gemessenen Konzentrationsbereich nicht gesättigt werden kann.

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen lassen sich mit denen anderer Autoren vergleichen. Menczel et al. (1983, 1984) fanden für Malathion und Lindan ebenfalls für die Haut eine nicht sättigbare Bindung über einen großen Konzentrationsbereich. Artuc et al. (1979, 1980) fanden bei der Anreicherung von Pharmaka in der Epidermis auch eine weitgehend konzentrationsunabhängige Bindung. Außerdem zeigten sie, daß sich die Pharmaka 8-MOP und 5-MOP gegenseitig nicht in ihrem Bindungsausmaß

beeinflussen und auch durch andere Pharmaka nicht zu verdrängen sind. Auch an diesem Ergebnis läßt sich sehen, daß die Bindung an die Epidermis nicht sättigbar und unspezifisch ist.

Die Ergebnisse aus Untersuchungen über die Konzentrationsabhängigkeit der Bindung an die Haut lassen sich mit denen an andere Gewebe vergleichen. Für den Muskel (Fichtl et al. 1980), die Leber (Junod 1972; Ludden et al. 1976), die Lunge (Ludden et al. 1976) und das Herz (Mundo et al. 1974) wird die Bindung von Pharmaka ebenfalls als weitgehend konzentrationsunabhängig und nicht sättigbar beschrieben.

2.3. pH-Abhängigkeit der Bindung:

Für die untersuchten Pharmaka war bis auf Ketoconazol in der Epidermis keine Abhängigkeit der Bindung vom pH-Wert der Inkubationsflüssigkeit zu finden. Dies weist neben der Bindung unionisierter auch auf eine Bindung ionisierter Pharmakonmoleküle hin (siehe B.3.2.).

Für die Bindung von Pharmaka an isolierte Komponenten der Haut konnte gezeigt werden, daß die Moleküle in ionisierter bzw. unionisierter Form gebunden werden. So können ionisierte Pharmaka an Melanin (Stüttgen 1982) und Phospholipide (Seydel und Wassermann 1976; Lüllmann und Wehling 1979) gebunden werden. Für das Corium fanden Engel et al. (1961) eine Bindung von Anionen. Andererseits haben viele der untersuchten Pharmaka (Griseofulvin, Glucocorticoide, 8-MOP) keine sauren oder basischen Gruppen und werden demnach im ungeladenen Zustand an die Hautkomponenten hoch gebunden.

Für die Epidermis fanden Taylor und Halprin (1977) eine pH-abhängige Aufnahme von Methotrexat. Von den Autoren wird ein aktiver Transportmechanismus in die Zelle vermutet. Dies könnte erklären, warum das Pharmakon in unionisierter Form höher gebunden wird. Menczel und Goldberg (1978) fanden für Lidocain, daß die in vitro Penetration vom pH-Wert abhängt. Bei den Versuchen diente die Haut als Membran zwischen zwei Kammerhälften. Die nicht wiedergefundene Pharmakonmenge wurde als von der Haut gebunden angenommen. Die errechnete Bindung an die Haut war vom pH-Wert abhängig.

Dagegen stellten Goldberg und Todoroff (1976) nur einen geringen Einfluß des pH-Wertes auf die Bindung von Phenytoin an verschiedene Proteine fest. Ebenso konnte die Bindung von mehreren Pharmaka an Muskel- (Fichtl 1983), Leber-, Nieren- und Lungengewebe (Nosak 1983) im Bereich von pH 6,4 bis pH 7,6 als weitgehend pH-unabhängig charakterisiert werden.

2.4. Abhängigkeit der Bindung von der Lipidlöslichkeit der Pharmaka:

Für die Pharmakonbindung an Epidermis und Corium war ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Bindung und der Lipophilie der Arzneistoffe zu finden. Von den drei verwendeten Lipidphasen, mit denen der Verteilungskoeffizient bestimmt wurde, ließ sich die Bindung an Epidermis und Corium am besten mit dem Oktanol-Verteilungskoeffizienten der unionisierten Substanz beschreiben.

Der Oktanol-Verteilungskoeffizient wird von einer Reihe von Autoren zur Charakterisierung der Pharmakon-

bindung an Gewebe und Proteine bevorzugt (Leo et al. 1971; Hansch und Leo 1979; Seydel und Schaper 1982). Die guten Korrelationen zwischen der Bindung von Pharmaka und dem Oktanol-Verteilungskoeffizienten werden auf die lipophilen Eigenschaften der Alkylgruppe und die polaren Eigenschaften der Hydroxylgruppe zurückgeführt. Dieser polare Teil des Moleküls befähigt Oktanol im Gegensatz zu Heptan zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen. Da Gewebestrukturen ebenfalls Gruppen zur Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung enthalten, läßt sich auch so die Korrelation zwischen dem Oktanol-Verteilungskoeffizienten und der Bindung an die Haut erklären. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der Feststellung, daß sich für mehrere Gewebe die Bindung von Pharmaka mit dem Verteilungskoeffizienten sauerstoffhaltiger, polarer Lipidphasen besser beschreiben läßt (Fichtl und Kurz 1981).

Die Ergebnisse der pH-Abhängigkeit der Bindung und die Berechnung, daß sich ca. $3/4$ der Bindung durch die lipophilen Eigenschaften erklären lassen (siehe B.3.4.), weisen darauf hin, daß neben den hydrophoben Wechselwirkungen auch polare Kräfte (Dipol-Dipol-Wechselwirkungen, Ionenbindung) an der Bindung beteiligt sind.

In der Literatur sind ebenfalls Arbeiten zu finden, die die Bindung von Pharmaka an Hautbestandteile in Abhängigkeit von ihrer Lipophilie festgestellt haben. Die Bindung verschiedener Corticoide an das Stratum corneum läßt sich mit dem Verteilungskoeffizienten des unpolaren Cyclohexans besser als mit dem Oktanol-Verteilungskoeffizienten beschreiben (Saket et al. 1984). Dagegen finden Bronaugh und Congdon (1984) für dieselbe Epidermisschicht eine gute Korrelation

zwischen der Bindung von Haarfärbemitteln und dem Okta-nol-Verteilungskoeffizienten. Mit dem gleichen Verteilungskoeffizienten läßt sich die Aufnahme von Corticoiden in Keratinocyten und Fibroblasten beschreiben (Ponec und Kempenaar 1983).

Bemerkenswert erscheint die Tatsache, daß die zwei Pharmaka, die die Haut als Zielorgan haben (Isotretinoin und Ketoconazol), die lipophilsten und die mit der höchsten Bindung der zehn untersuchten Arzneistoffe sind. Von Griseofulvin und 8-MOP, Pharmaka die ebenfalls bei systemischer Anwendung die Haut als Zielorgan haben, ist bekannt, daß sie sehr lipophil sind. Da die einzelnen Pharmaka aber unterschiedliche Angriffspunkte und Wirkweisen haben, kann eine ausgeprägte Lipophilie als Voraussetzung für Pharmaka mit dem Wirkort Haut nur als Spekulation gewertet werden.

2.5. Interindividuelle Schwankungen der Pharmakonbindung:

In der Literatur lassen sich viele Hinweise finden, daß die Bindung von Pharmaka an die Plasmaproteine großen interindividuellen Schwankungen unterworfen sein kann. Auch bei den von uns verwendeten Pharmaka läßt sich eine weite Spanne individuell variierender Bindung an die Plasmaproteine finden. Einige Beispiele sollen hier aufgezählt werden:

Phenobarbital - 20 bis 75 % Bindung (Walther und Meyer 1979)

Phenytoin - 60 bis 92 % Bindung (Walther und Meyer 1979)

Salicylsäure	- 85 bis 96 % Bindung (Netter et al. 1985)
Warfarin	- 84 bis 96 % Bindung (Yacobi et al. 1976)

Interindividuelle Schwankungen für die Gewebebindung sind kaum untersucht, dennoch läßt sich abschätzen, daß auch hier Pharmaka unterschiedlich gebunden werden können. Fichtl (1974) fand für mehrere Pharmaka, daß vom Muskelgewebe verschiedener Personen die Arzneistoffe unterschiedlich gebunden werden. Schuhmann (1985) stellte bei der Gewebebindung von Chinidin am Kaninchen ebenfalls deutliche Unterschiede fest.

Die von uns gefundenen Zusammenhänge zwischen der Bindung und dem Gesamtlipid- bzw. Proteingehalt sind Hinweise, daß es auch bei der Bindung an die Haut interindividuelle Unterschiede gibt.

Vom Gesamtlipidgehalt der Epidermis und des Coriums wurde meist die Bindung sehr lipophiler Arzneistoffe beeinflusst. Daß der Lipidgehalt eines Gewebes die Konzentration eines Pharmakons beeinflussen kann, zeigten Sgaragli et al. (1983) für Ratten, die an einer Phospholipidose litten. In dieser Untersuchung waren für das lipophile Chlorimipramin und seinen Metaboliten durch den erhöhten Phospholipidgehalt in den betroffenen Organen auch signifikant erhöhte Konzentrationen des Pharmakons zu finden.

Die festgestellte Abhängigkeit der Bindung von Phenytoin, Ketoconazol und Warfarin vom Proteingehalt steht in Einklang mit den Ergebnissen anderer Untersuchungen. Für Ketoconazol konnten Meuldermans et al. (1978) bei Mikrosomenfraktionen aus verschiedenen Organen zeigen, daß die Bindung mit steigendem Proteingehalt

zunimmt. Goldberg und Todoroff (1976) fanden für Phenytoin, daß bei Gehirnhomogenaten und isolierten Proteinen das Ausmaß der Bindung vom Proteingehalt abhängt.

2.6. Vergleich der bestimmten Parameter (Gesamtlipid- und Stickstoffgehalt) der Haut mit Literaturangaben:

Die Bestimmung des Stickstoffgehaltes von Epidermis und Corium wurde mit dem getrockneten, nicht entfetteten Gewebe durchgeführt. In der Literatur sind aber nur Angaben des Stickstoffgehaltes für das entfettete Gewebe zu finden. Zusätzlich haben wir für einen Teil der Hautproben eine Bestimmung aus entfettetem Gewebe durchgeführt, deren Ergebnisse sich mit den Literaturangaben vergleichen lassen.

Bei Kindern wird der Stickstoffgehalt für die ganze Haut mit 11,8 % bis 14,9 % angegeben (Adamčič und Friser-Herman 1967). Für das Corium Erwachsener ist in der Literatur ein Stickstoffgehalt von 15,3 % (Morsches et al. 1966) bis 16,4 % (Eisele und Eichelberger 1945) zu finden. Stüttgen und Schäfer (1974) machen für den Stickstoffgehalt eine Angabe von 15 % bis 16 %. Durch die Umrechnung des Stickstoffgehaltes der Epidermis auf den Proteingehalt (siehe B.3.3.2.) läßt sich unser Ergebnis (62,2 % Proteingehalt) mit dem von Im und Hoopes (1974) vergleichen, die für die Epidermis einen Proteingehalt von 70 % fanden.

Die von uns ermittelten Werte für den Gesamtlipidgehalt für Epidermis (323 mg/g*) und Corium (208 mg/g*) liegen höher als die in der Literatur angegebenen Werte.

Für die menschliche Epidermis sind Untersuchungen

* vom Trockengewicht

durchgeführt worden, bei denen ebenfalls der Gesamtlipidgehalt bestimmt wurde. Einige Beispiele seien hier aufgezählt: 7,1 %* (v. Glasenapp und Leonhardi 1953), 8 % bis 16 %* (Wheatley und Reinertson 1958), 16 %* (Reinertson und Wheatley 1959), 18,1 %* (Im und Hoopes 1974). Bei den hier aufgeführten Untersuchungen sind methodische Unterschiede zu unseren Versuchen zu finden, durch die sich die verschiedenen Ergebnisse erklären lassen:

- In den meisten Fällen wurden die Oberflächenlipide der Epidermis nicht mitbestimmt, da sie vor den Versuchen durch Waschen oder Behandlung mit einem organischen Lösungsmittel entfernt wurden.
- Die Epidermis wurde durch Wärmeeinwirkung (ca. eine Minute) bei 60 °C vom Corium getrennt. Da der Schmelzpunkt der Hautlipide bei 35 °C liegt (Kirk 1966) kann nicht ausgeschlossen werden, daß bei der Trennung Lipide verloren gehen.
- Als Extraktionsmittel wurde meist Aceton verwendet. Schmid und Chelf (1976) fanden bei einem Vergleich der Extraktionsmittel Chloroform-Methanol und Aceton, daß das von uns verwendete Chloroform-Methanol-Gemisch 1,5 mal mehr Lipide aus der Epidermis extrahiert als Aceton.

Für das menschliche Corium fanden wir nur bei v. Glasenapp und Leonhardi (1953) eine Angabe über den Gesamtlipidgehalt (3,05 %*). Für diese Untersuchung lassen sich die gleichen Einwände für das Extraktionsmittel wie bei der Epidermis anwenden. Aus Untersuchungen an Tieren ergeben sich Hinweise, daß auch im Corium der Lipidgehalt höher liegen kann. So wurde ein Gesamtlipidgehalt der

* vom Trockengewicht

Haut bei Küken von 18,5 %** (Yeh und Leveille 1973) bzw. bei Mäusen von 21 %** (Wilkinson und Karasek 1966) festgestellt.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß der Gesamtlipidgehalt beider Hautschichten interindividuell variieren kann. Diese Unterschiede lassen sich möglicherweise auf einen variierenden Blutlipidgehalt (Björnheden et al. 1980) oder auf unterschiedliche Ernährungsgewohnheiten zurückführen (Freinkel und Aadalen 1964; Pochi et al. 1970). Eine Abhängigkeit des Lipidgehaltes der Haut vom Körpergewicht stellten Coffey et al. (1978) bei Ratten fest. Sie fanden bei den mageren Tieren einen Gesamtlipidgehalt der Haut von 8,2 %** und bei den übergewichtigen Ratten einen Gesamtlipidgehalt von 41,9 %**.

2.7. Beeinflussung der Bindung durch die Gewebelipide:

Für lipophile Pharmaka konnte eine Beeinflussung der Bindung in den beiden Hautschichten durch einen variierenden Gesamtlipidgehalt gefunden werden. Auf Grund der Untersuchungen mit entfettetem Gewebe läßt sich aber zeigen, daß die Gewebelipide die Bindung nur geringfügig beeinflussen. Die teilweise hohe Bindung an Epidermis und Corium kann also auch nicht durch die Gewebelipide erklärt werden. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit denen anderer Untersuchungen. Fichtl et al. (1980) fanden für sechs Pharmaka auch nur einen geringen Einfluß der Lipide bei der Bindung an entfettetes Muskelgewebe. Goldberg und Todoroff (1976) zeigten für Phenytoin, daß die Bindung entfetteter Gehirnhomogenate höher ist als bei unbehandeltem Gewebe.

Bei den eigenen und zitierten Ergebnissen ist

** vom Feuchtgewicht

festzustellen, daß der Einfluß auf die Bindung durch die Entfettung bei verschiedenen Pharmaka qualitativ und quantitativ unterschiedlich ist. Dennoch läßt sich abschätzen, daß die Gewebelipide nicht alleine für die Bindung verantwortlich sein können (Fichtl et al. 1980; Della Corte und Sgaragli 1984). Dieser Sachverhalt trifft auch für die Bindung an Epidermis und Corium zu. Deshalb liegt die Vermutung nahe, daß die Bindung an andere Gewebekomponenten erfolgt. Bei dem großen Anteil der Proteine an der Trockenmasse dürfte besonders an sie ein Großteil des Pharmakons gebunden werden.

In B.2.1. wurde festgestellt, daß neun der zehn Pharmaka signifikant höher an die Epidermis als an das Corium gebunden werden. Dieser signifikante Unterschied in der Bindung an die zwei Gewebe läßt sich aber nicht auf den höheren Lipidgehalt der Epidermis zurückführen, da nach der Entfettung die signifikanten Unterschiede in der Bindung an die zwei Hautschichten bestehen bleiben.

Dieses Ergebnis läßt sich mit den Befunden von Vahlquist et al. (1982) vergleichen. Sie fanden im Oberflächenlipidfilm menschlicher Haut beträchtliche Konzentrationen von Karotin und Retinol. Die Autoren betonen aber, daß diese im Lipidfilm gefundenen Mengen nicht ausreichen, um die Differenz zwischen den in Epidermis und Corium festgestellten Konzentrationen der Retinoide zu erklären.

2.8. Zusammenhang zwischen der Bindung an Epidermis und Corium und andere Gewebe:

Bei einem Vergleich der Pharmakonbindung an Epidermis und Corium konnte gezeigt werden, daß ein signifikanter

Zusammenhang zwischen der Bindung an die beiden Gewebe besteht. Um weitere Hinweise auf die Pharmakonbindung an Epidermis und Corium zu erhalten, verglichen wir unsere Ergebnisse mit denen an andere menschliche Gewebe. Bei einem Vergleich der Bindung an die Epidermis mit der Bindung an Muskelgewebe ist ein hochsignifikanter Zusammenhang festzustellen (Abb. 11a).

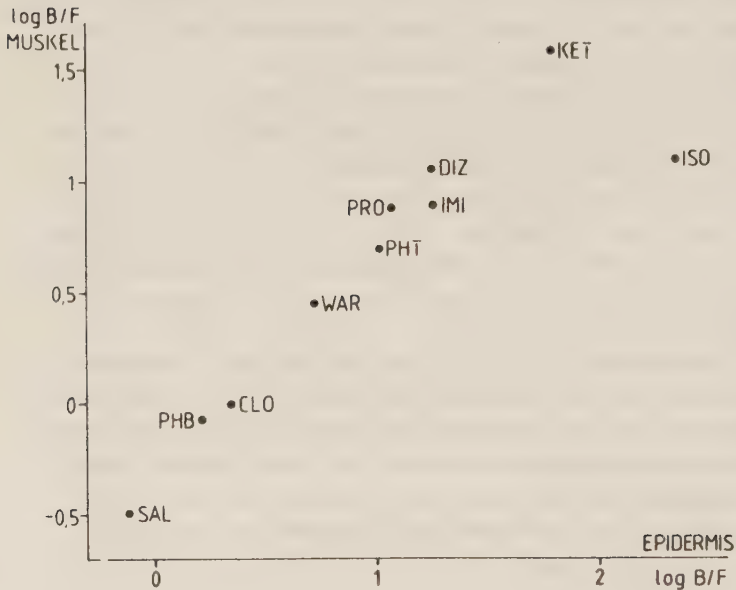


Abb. 11a:

Zusammenhang zwischen der Bindung an Epidermis und Muskelhomogenat*.

$$r = 0,91 \quad p < 0,001$$

$$\log B/F_{\text{Epidermis}} = 1,29 \cdot \log B/F_{\text{Muskel}} - 0,21$$

* Daten für die Muskelbindung aus Fichtl (1983)

Für neun der zehn Pharmaka ist ein nahezu linearer Zusammenhang zu finden, während die Isotretinoinbindung an die Epidermis höher ist als im Muskel. Dies ist möglicherweise auf ein spezifisch bindendes Protein (Cyto-sol Retinoid Acid Binding Protein) in der Epidermis zurückzuführen (Siegenthaler et al. 1984; Di Giovanna et al. 1985).

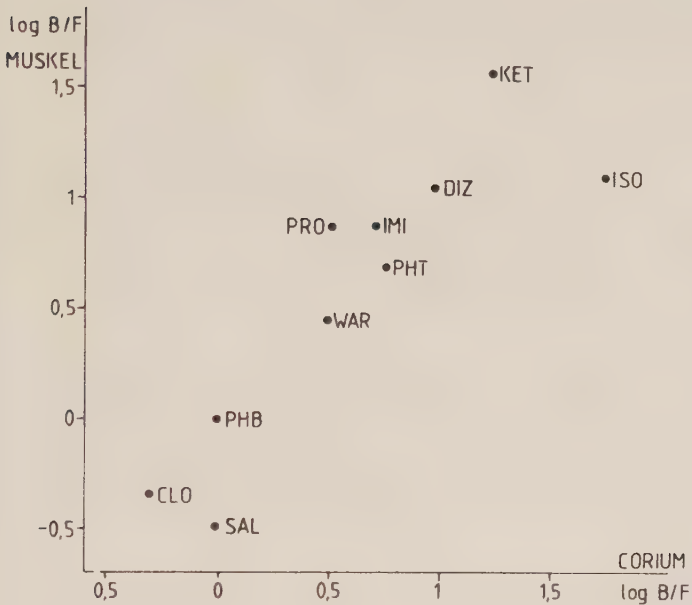


Abb. 11b:

Zusammenhang zwischen der Bindung an Corium und Muskelhomogenat*.

$$r = 0,85 \quad p < 0,01$$

$$\log B/F_{\text{Corium}} = 1,16 \cdot \log B/F_{\text{Muskel}} + 0,1$$

* Daten für die Muskelbindung aus Fichtl (1983)

Im Gegensatz zur Epidermis ist dieses Protein im Muskel (Ratte) nicht gefunden worden (Ong und Chytil 1975). Demnach kommt für die Isotretinoinbindung in der Epidermis neben einer unspezifischen auch eine spezifische Bindung in Frage.

Bei einem Vergleich der Bindung der Pharmaka an das Corium und der Muskelbindung ist ebenfalls ein signifikanter, aber schwächerer Zusammenhang zu finden (Abb. 11b).

Neben den Daten für den Muskel wurde die Pharmakombindung an Epidermis und Corium auch mit der an Niere, Leber, Lunge, Herz und Gehirn verglichen (Tab. 5).

	Niere	Leber	Lunge	Herz	Gehirn
Epidermis	0,96**	0,97**	0,75 n.s.	0,96**	0,98**
Corium	0,83*	0,84*	0,71 n.s.	0,83*	0,86*

Tab. 5:

Korrelationskoeffizienten (r) für den Zusammenhang zwischen der Bindung an Epidermis bzw. Corium und fünf andere menschliche Gewebe¹ für die Pharmaka Diazepam, Imipramin, Phenytoin, Propranolol, Warfarin und Salicylsäure.

* = $p < 0,05$

** = $p < 0,01$

Hierfür waren im Gegensatz zum Muskel allerdings Daten für nur sechs Pharmaka zu finden. Dennoch zeigt sich auch hier, daß die Korrelationen für die Epidermis besser sind als für das Corium.

¹Daten für die Bindung der Pharmaka an Niere, Leber, Lunge, Herz, Gehirn: v. Horstig; Touroutoglou;

Diese Tatsache läßt sich möglicherweise auf morphologische Unterschiede zwischen Epidermis und Corium zurückführen. Hier scheint das zellreiche Gewebe der Epidermis den anderen Organen ähnlicher zu sein als das zellarme und bindegewebsreiche Corium.

Der Sachverhalt, daß ein enger Zusammenhang zwischen der Pharmakonbindung an verschiedene Gewebe besteht, wurde auch schon von anderen Autoren vorher beschrieben (Kurz und Fichtl 1983; Fichtl 1983; Schuhmann 1985).

2.9. Zusammenhang zwischen der Bindung an Epidermis bzw. Corium und dem Plasma:

Die Bestimmung der Plasmabindung ist, verglichen mit der Gewebefindung, relativ einfach durchzuführen. Es wurde deshalb von mehreren Autoren versucht, auf Grund der Daten für die Plasmabindung eine Vorhersage für die Gewebefindung zu machen (Bischoff und Dedrick 1968; Jusko und Gretch 1976; Khalafallah und Jusko 1984). Die theoretische Grundlage dafür basiert auf der Vorstellung, daß das in den Geweben enthaltene Albumin für die Bindung verantwortlich ist.

Der Zusammenhang zwischen der Epidermisbindung und der Plasmabindung ist schwach signifikant (Abb. 12a). Für das Corium dagegen ist eine bessere Korrelation zu finden (Abb. 12b).

Die gefundenen Ergebnisse entsprechen aber nicht den Resultaten anderer Autoren mit anderen Geweben (Fichtl und Kurz 1978; Kurz und Fichtl 1983; Fichtl 1983; Schuhmann 1985). Diese unterschiedlichen Befunde bedeuten aber nicht, daß von der Plasmabindung auf

die Bindung in den zwei Hautschichten extrapoliert werden kann. Die Diskrepanz der Ergebnisse ist vielmehr durch die verschiedenen Pharmaka, die in den Untersuchungen verwendet wurden, bedingt.

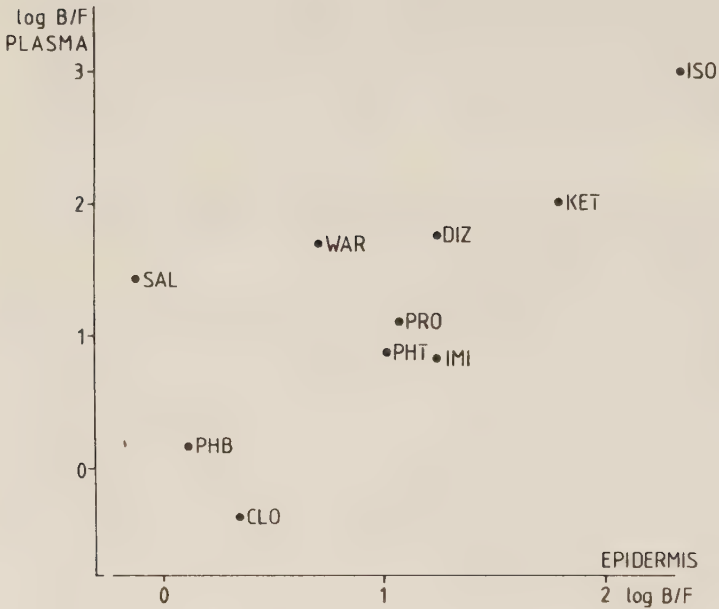


Abb. 12a:

Zusammenhang zwischen der Bindung an Epidermis und menschlichem Plasma*.

$$r = 0,70 \quad p < 0,05$$

$$\log B/F_{\text{Epidermis}} = 1,07 \cdot \log B/F_{\text{Plasma}} + 0,33$$

* Daten für die Plasmabindung: Meuldermans et al. (1978); Fichtl (1983); Ward et al. (1984);

So wurden bei den zitierten Autoren mehr Pharmaka untersucht, die sich durch eine starke Plasmabindung und mäßige Gewebebindung auszeichnen (z.B. Salicylsäure, Warfarin).

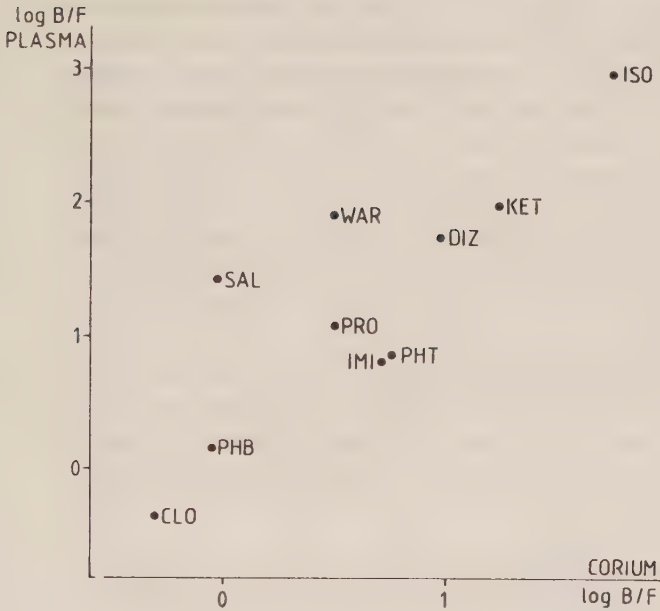


Abb. 12b:

Zusammenhang zwischen der Bindung an Corium und menschlichem Plasma*.

$$r = 0,84 \quad p < 0,01$$

$$\log B/F_{\text{Corium}} = 0,75 \cdot \log B/F_{\text{Plasma}} + 0,35$$

* Daten für die Plasmabindung: Meuldermans et al. (1978); Fichtl (1983); Ward et al. (1984);

Für den besseren Zusammenhang zwischen der Corium- und der Plasmabindung könnte es zwei Erklärungen geben:

a) Das Corium enthält etwa zweimal soviel Albumin wie andere Organe (Jusko und Gretch 1976; Tsuji et al. 1985). Dieses im Corium enthaltene Albumin (etwa 25 % bis 30 % der Plasmakonzentration) könnte an der Bindung beteiligt sein und so die gute Korrelation zwischen der Bindung an das Plasma und an das Corium erklären.

b) Im Corium sind andere Komponenten (z.B. Kollagen oder Glykosaminoglykane) enthalten, die Pharmaka in ähnlichem Ausmaß wie das Albumin binden können.

Diese Vermutungen werden durch Ergebnisse anderer Autoren bestätigt. So waren für Pharmaka, die eine starke Plasmabindung und eine geringe Gewebefindung aufweisen, in vivo mit die höchsten Konzentrationen im Corium zu finden (Phenylbutazon - Bickel und Gerny 1980; Salicylsäure - Yoshikawa et al. 1984).

In diesem Zusammenhang ließe sich auch erklären, warum Salicylsäure als einziges der zehn Pharmaka im Corium höher gebunden wurde als in der Epidermis.

2.10. Vergleich der in vitro Bindung mit in vivo gefundenen Daten:

Bei in vitro Untersuchungen stellt sich die Frage, ob sich die gefundenen Ergebnisse auch auf in vivo Bedingungen übertragen lassen. Für die Bindung von

Pharmaka an Gewebe existieren Arbeiten, die zeigten, daß auf Grund von in vitro Methoden eine Vorhersage der in vivo Gewebekonzentration möglich ist (Lin et al. 1982; Igari et al. 1983; Fichtl 1983; Schuhmann 1985).

Für fünf der zehn untersuchten Pharmaka ließen sich Arbeiten finden, die bei in vivo Verteilungsstudien mit Ratten auch die Pharmakonkonzentration in der Haut untersucht haben. Um zu überprüfen, ob ein Zusammenhang zwischen in vivo und in vitro Daten besteht, müssen die Ergebnisse auf ein vergleichbares Bezugsmaß umgerechnet werden. In den oben angeführten Arbeiten wird davon ausgegangen, daß sich der Quotient aus der in vivo gefundenen Gewebekonzentration (c_G) und der freien, ungebundenen Plasmakonzentration (c_{pf}) mit dem Quotienten der in vitro Gewebekonzentration (T) und der freien Konzentration im Gewebewasser (F) vergleichen läßt. Für die so errechneten Parameter zeigt sich, daß trotz möglicher Speziesunterschiede und der Tatsache, daß die Daten aus sechs verschiedenen Quellen stammten, ein guter Zusammenhang zu finden ist (Abb. 13).

2.11. Quantitative Bedeutung der Pharmakonbindung an die Haut:

Da die Haut ca. 10 % des Körpergewichtes ausmacht, stellt sich die Frage, welche Bedeutung dieses große Organ für die Verteilung eines Pharmakons im Organismus hat. Auf Grund der geringen Masse der Epidermis (2 % bis 3 % des Hautgewichtes, Wester und Maibach 1983), kommt für diese Fragestellung hauptsächlich die Bindung an das Corium in Betracht.

Für den Anteil der Haut am Körpergewicht existieren in der Literatur sehr unterschiedliche Angaben.

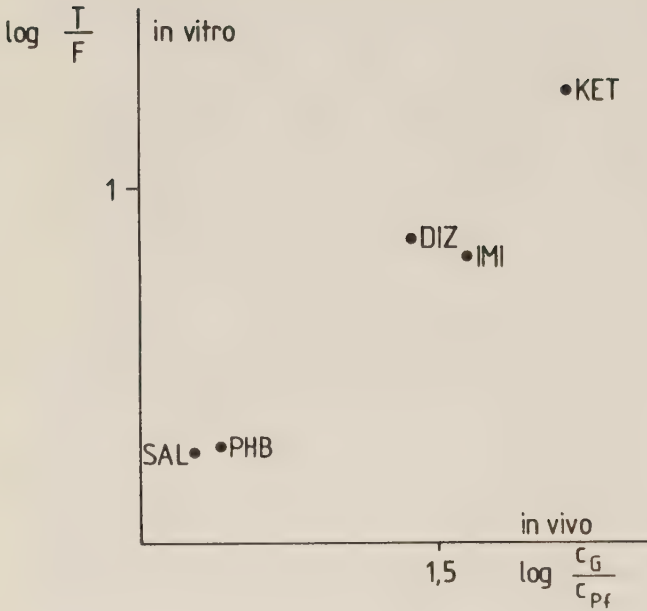


Abb. 13:

Zusammenhang zwischen den in vitro und in vivo ermittelten Daten für die Haut.

in vivo:

$$\frac{c_G}{c_{Pf}} = \frac{\text{Gesamtkonzentration im Gewebe}}{\text{Konzentration des freien, ungebundenen Pharmakons im Plasma}}$$

in vitro:

$$\frac{T}{F} = \frac{\text{Gesamtkonzentration im Gewebe}}{\text{Konzentration des freien Pharmakons im Gewebewasser}}$$

In vivo Daten aus:

DIZ - Diazepam (Igari et al. 1983); IMI - Imipramin (Bickel und Gerny 1980); KET - Ketoconazol (Michiels et al. 1979); PHB - Phenobarbital (Igari et al. 1982); SAL - Salicylsäure (Yoshikawa et al. 1984);

Sie reichen von 7 % (Renwick 1982) bis zu 18 % (Skelton 1927) vom Körpergewicht. Für die folgenden Berechnungen haben wir die Angaben für die einzelnen Massenanteile der Organe aus einer Quelle verwendet (Pfeiffer et al. 1984). Die Haut hat hier einen Anteil von 10 % am Körpergewicht.

Für sieben menschliche Gewebe und das Plasma wurde mit in vitro Daten berechnet, welche Menge Pharmakon an das gesamte Gewebe bzw. Plasma gebunden wird. Diese Berechnung berücksichtigt das Ausmaß der Bindung und die Masse der acht untersuchten Verteilungsräume. Vergleicht man die gebundenen Pharmakonmengen im gesamten Organ bzw. Plasma, fällt auf, daß an das Muskelgewebe auf Grund seiner großen Masse die größten Pharmakonmengen gebunden werden (Abb. 14). Für alle sechs Pharmaka kommt der Haut nach dem Muskel die zweitgrößte Bedeutung als Verteilungsorgan zu.

An diesen Beispielen zeigt sich, daß die Haut auf Grund ihrer Masse und ihrer Bindungseigenschaften größere Mengen eines Pharmakons binden kann als das Plasma. Dabei muß allerdings betont werden, daß die Berechnung mit in vitro Daten durchgeführt wurde. So konnte nicht berücksichtigt werden, daß die Gewebe bzw. das Plasma in vivo um das Pharmakon konkurrieren.

Bei einem Vergleich mit in vivo Verteilungsstudien läßt sich aber abschätzen, daß die in vitro Berechnung qualitativ richtig ist und somit die Bedeutung der Haut als Verteilungsorgan bestätigt wird. Dieser Sachverhalt soll noch am Beispiel einer in vivo Untersuchung mit 6 CB, einem chlorierten Kohlenwasserstoff, verdeutlicht werden. Wyss et al. (1982) fanden nach der Gabe von 6 CB in Ratten 30 % der Gesamtkörpermenge in der Haut. Nach dem Fasten der Tiere stieg der Anteil von 6 CB in der Haut auf 55 % der gesamten Menge im Körper an.

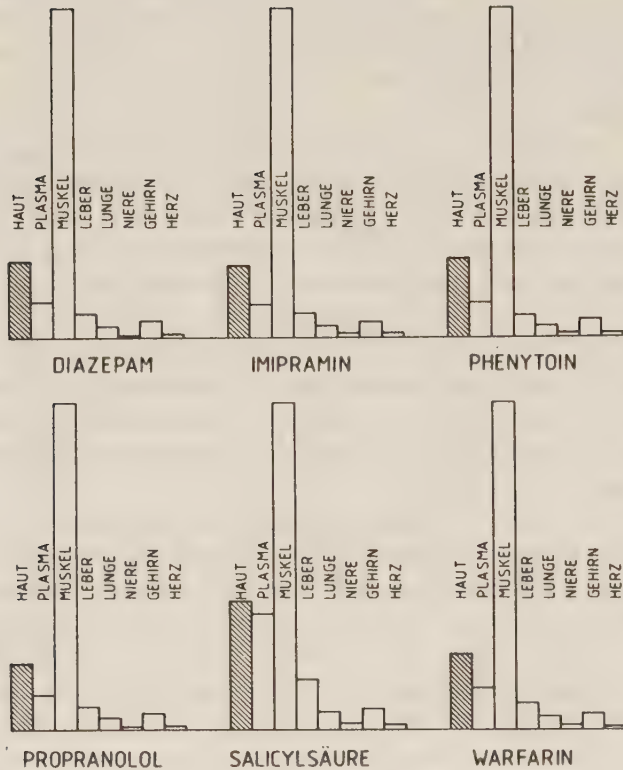


Abb. 14:

Vergleich der gebundenen Pharmakonmenge im Gewebe bzw. Plasma (in vitro).

Die Säulen stellen die gebundene Pharmakonmenge im ganzen Organ bzw. Plasma dar, wobei die gebundenen Mengen relativ zu der im Muskelgewebe (=1) dargestellt sind.

Für einen Normalgewichtigen (70 kg) wurden folgende Massen für die Organe bzw. das Plasma angenommen:*

* Daten aus: Pfeiffer, Pflegel, Borchert (1984)

Fortsetzung Legende Abb. 14:

Plasma	Muskel	Nieren	Leber
2,8 kg (4%)	28 kg (40%)	0,35 kg (0,5%)	1,96 kg (2,8%)
Herz	Gehirn	Lunge	Haut
0,35 kg (0,5%)	1,4 kg (2%)	1,05 kg (1,5%)	7 kg, davon 200 g Epidermis (10%)

(Angaben in Klammern: Anteil am Körpergewicht in %)

D. METHODIK

1. Gewebeproben:

Die Versuche wurden mit menschlicher Haut durchgeführt. Die Proben stammten von Unfalltoten und wurden von der Außenseite des Oberschenkels entnommen. Insgesamt handelte es sich um 27 Hautproben von Personen beiderlei Geschlechts im Alter von 18 bis 76 Jahren. Es wurden nur Proben von gesunden Personen verwendet (Obduktion), deren Tod nicht länger als 36 Stunden zurück lag. Die entnommenen Hautstücke wurden in Plastikfolien eingeschweißt und bis zur Verwendung bei -30°C eingefroren.

2. Präparation der Hautschichten:

2.1. Epidermis:

Epidermis und Corium wurden in Anlehnung an die Saugblasenmethode von Kiistala (1968) getrennt. Man setzt dazu auf die Epidermis eine Glasglocke auf, in welcher ein Unterdruck bis zur Ausbildung einer Blase erzeugt wird. Die Versuche wurden mit einer selbst zusammengestellten Apparatur durchgeführt (Abb. 15). Durch Verwendung von Glasglocken mit einem Durchmesser von 2,5 cm betrug die Ausbeute pro Blase ca. 40 mg Epidermis (Feuchtgewicht). Aus einer Hautprobe konnten durchschnittlich 150-200 mg Epidermisgewebe gewonnen werden.

Durchführung:

Von den Hautproben wurde das subcutane Fettgewebe und falls erforderlich die Haare mit einer Schere entfernt.

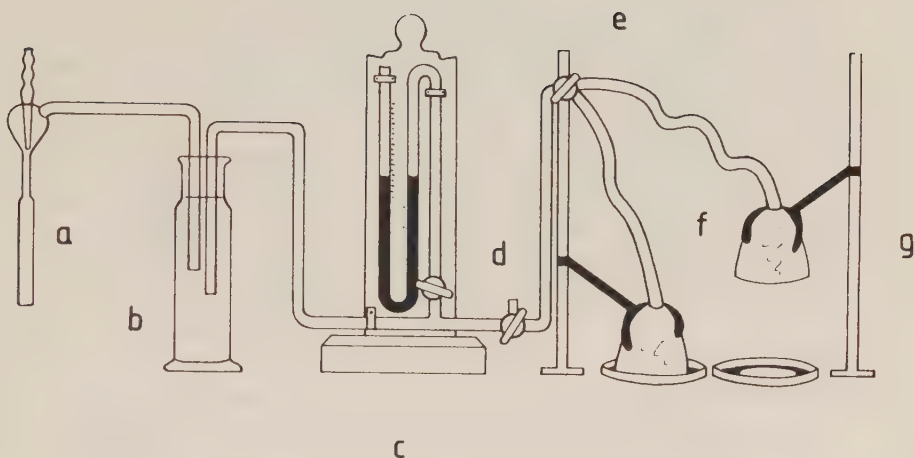


Abb. 15:

Verwendete Apparatur zur Trennung der Epidermis vom Corium.

- | | |
|--------------------------|--|
| a) Wasserstrahlpumpe; | b) Woulff'sche Flasche; |
| c) Quecksilbermanometer; | d) Belüftungsventil; |
| e) Dreiwegehahn; | f) Saugglocken aus Glas ($\varnothing$ 2,5 cm); |
| g) Stativ; | |

Das Hautstück wurde in ca. 3 x 3 cm große Stücke aufgeteilt. Die Stücke wurden auf ein befeuchtetes Filterpapier (1 ml 0,9 %ige Kochsalzlösung) in eine Petrischale gelegt. Die Glasglocke wurde auf die Epidermisseite der

Haut gesetzt und über das Stativ fest angepresst. Über die Wasserstrahlpumpe wurde ein Unterdruck von -300 mm Hg angelegt. Nach ca. 2 Stunden hatte sich eine vollständige subepidermale Blase ausgebildet. Die Zeit zum Abheben der Blase konnte allerdings erheblich variieren. Die Zeitunterschiede sind auf unterschiedliche Raumtemperaturen und interindividuelle Unterschiede zurückzuführen (Kiistala 1968; Peachey 1971).

Die abgehobene Epidermis konnte jetzt mit einer Pinzette abgezogen werden. Sie wurde mit 0,9 %iger Kochsalzlösung gewaschen, auf Filterpapier abgetupft und bis zur weiteren Verwendung bei -30 °C eingefroren.

2.2. Corium:

Die Bindungsversuche wurden mit dem oberen Corium durchgeführt. Dieser Teil der Haut wurde durch einen horizontalen Schnitt als 0,2 mm dickes Gewebescheibchen vom restlichen, epidermisfreien Corium abgetrennt.

Der Schnitt durch das Corium wurde üblicherweise mit einem Gefriermikrotom (2.2.1.) durchgeführt. Zur Untersuchung des Einflusses des Gefrierens auf die Bindungseigenschaften der Haut wurde ein Gerät zur Herstellung von Schnitten aus frischem Gewebe verwendet (2.2.2.).

2.2.1. Gefriermikrotom:

Gerät: Gefriermikrotom 1205, Fa. Jung.

Die epidermisfreie Haut wurde mit einer Schere geschnitten und mit 0,9 %iger Kochsalzlösung kurz gespült.

Bei allen Arbeiten mit dem Gefriermikrotom wurde ein Messer mit dem Schliff "d", verwendet. Der eingestellte Skalenwert "0" für die Messereneigung entspricht einem Freiwinkel von 5° (Firmenangabe).

Um einen parallelen und gleichmäßigen Schnitt durch das Corium zu bekommen, wurde zuerst die Unterseite begradigt. Dazu wurde die Haut mit der Oberseite nach unten auf dem Gefriertisch festgefroren. Mit einigen Schnitten wurde noch anhaftendes Unterhautfettgewebe und unteres Corium entfernt. Die Probe wurde wieder aufgetaut und gewendet. Mit Hilfe eines Objektträgers wurde das Hautstück plan angefroren. Zur besseren Fixierung des Gewebes beim Schneiden wurde vorher 0,9 %ige Kochsalzlösung auf den Gefriertisch getropft.

Vom oberen Corium wurde dann die 0,2 mm dicke Scheibe abgetragen und bis zur weiteren Verwendung bei -30°C eingefroren. Das verbliebene Corium wurde verworfen.

2.2.2. Herstellung von Schnitten aus frischem Gewebe:

Aus dem frischen, epidermisfreien Corium wurde mit einem Metallrohr ein Gewebestück ausgebohrt. Der Gewebezylinder wurde in ein Schnittgerät (Kurz 1961) eingesetzt und bei einem Unterdruck von -100 mm Hg fixiert. Mit einer Rasierklinge wurde dann ein horizontaler Schnitt von 0,2 mm durch das Corium gemacht. Das erhaltene Gewebescheibchen wurde mit 0,9 %iger Kochsalzlösung abgespült und die Bindungsversuche sofort durchgeführt.

3. Herstellung der Pharmakonlösungen:

Die Pharmaka wurden zu einer Stammlösung mit demineralisiertem Wasser gelöst. In mehreren Verdünnungsschritten wurde mit dem Inkubationspuffer die gewünschte Konzentration (meist 10^{-6} Mol Pharmakon/l) hergestellt. Auf Grund ihrer schlechten Lösungseigenschaften wurden die Stammlösungen für Diazepam mit 90 %igem Ethanol, für Phenytoin und Salicylsäure mit 0,01 N Natronlauge und für Ketoconazol mit 0,01 N Salzsäure hergestellt.

Das radioaktiv markierte Pharmakon wurde der unmarkierten Lösung zugegeben und falls notwendig in der Konzentration berücksichtigt. Die Isotretinoin-Lösungen wurden nur mit markiertem Pharmakon hergestellt, da das markierte Isotretinoin eine geringe spezifische Aktivität hat. Die Isotretinoin-Lösungen wurden lichtgeschützt hergestellt und verwendet.

4. Bindung von Pharmaka an Epidermis und Corium:

Die Bindungsversuche mit Epidermis und Corium wurden getrennt durchgeführt.

Die Gewebeproben wurden in einer gepufferten Pharmakonlösung bis zur Gleichgewichtseinstellung inkubiert. Nach Versuchsende konnte durch Bestimmen der Pharmakonkonzentration im Gewebe und in der Pharmakonlösung die gebundene Pharmakonmenge berechnet werden.

In Abb. 16 wird der gesamte Versuchsablauf zusammengefaßt.

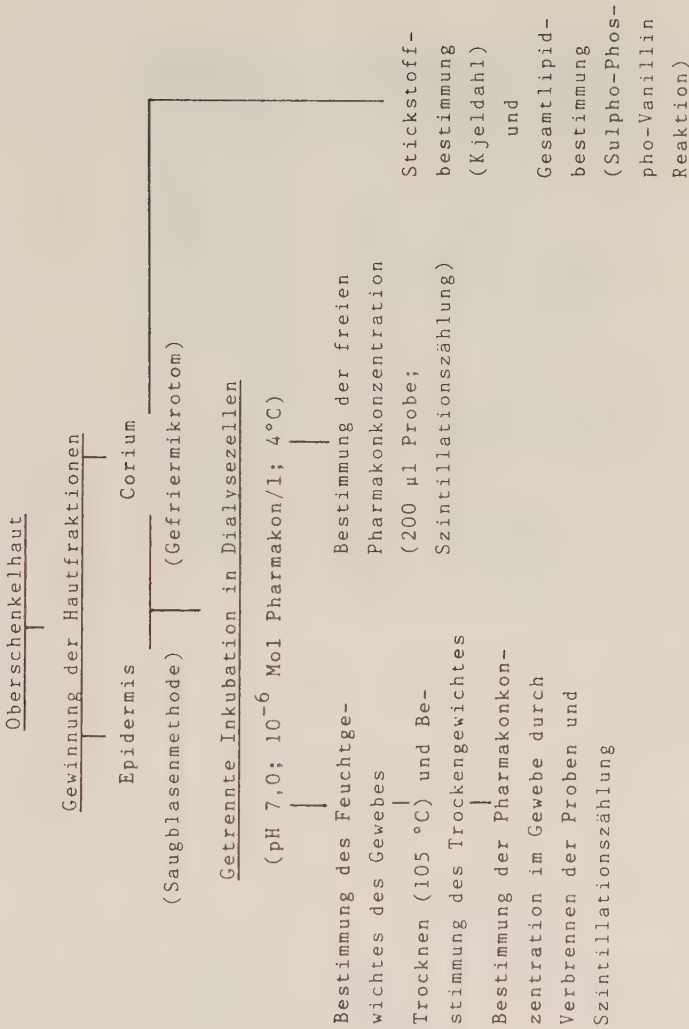


Abb. 16:

Schematischer Versuchsablauf

4.1. Inkubation in Dialysezellen:

Geräte und Materialien: Dianorm^R-Dialysegerät mit V₄A-Stahlzellen (dem Typ GD 2 original nachgebaut), Fa. Diachema;
Dialysemembran Diachema^R (Durchmesser 63 mm, Membrandicke 0,025 mm, molekulare Ausschlußgrenze 5000 D), Fa. Diachema;
Digital pH-Meter Nr. 646, Fa. Knick;
Digitalwaage Typ 1205, Fa. Satorius.

Bei der Inkubation der Epidermis- und Coriumscheibchen schilfern Gewebeteile ab und lösliche Proteine werden ausgeschwemmt. Das Pharmakon kann an diese Gewebebestandteile gebunden werden. Die freie Pharmakonzentration im Gewebewasser wird jedoch durch Bestimmung der freien Pharmakonzentration in der Inkubationsflüssigkeit berechnet (Gl. 8). Der an die abgeschilferten Gewebeteile bzw. die in Lösung gegangenen Proteine gebundene Pharmakonanteil würde dadurch fälschlicherweise als freier Anteil erscheinen und die Berechnung der freien Pharmakonzentration im Gewebewasser würde zu hoch sein.

Um diesen Fehler auszuschalten, wurde die Inkubation mit einer Gleichgewichtsdialyse verbunden. Die Gewebescheibchen wurden in einer Hälfte der Dialysezellen in einer Pharmakonlösung inkubiert, während die zweite Kammerhälfte eine isotone Pufferlösung enthielt (Abb. 17). Aus dieser Kammerhälfte wurde nach dem Versuchsende die freie Konzentration (c_f') des Pharmakons bestimmt.

Im folgenden werden die Kammerhälften als "Inkubationsseite" bzw. "Pufferseite" bezeichnet.

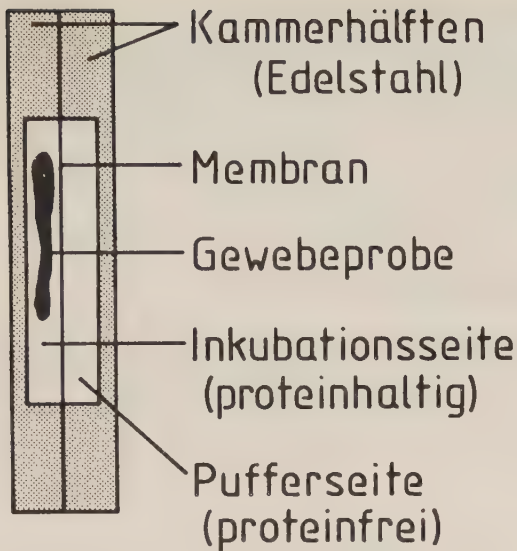


Abb. 17:

Längsschnitt durch eine Dialysezelle mit Gewebeprobe (schematisch).

Durchführung:

Die Dialysemembranen wurden dreimal 30 Minuten in demineralisiertem Wasser gewässert und im Inkubationspuffer (Tab. 6) bis zur Verwendung aufbewahrt. In eine Kammerhälfte wurden ca. 25 mg Gewebe eingewogen, die Dialysemembran auf einem Filterpapier abgetupft, eingelegt und mit der zweiten Kammerhälfte verschlossen.

I Inkubationspuffer pH 6,4:

Zusammensetzung: 0,5 Mol/l Na_2HPO_4 -Lösung 15,4 ml
 0,5 Mol/l NaH_2PO_4 -Lösung 34,6 ml
 demineralisiertes Wasser ad 200,0 ml

Molarität: 0,125 Mol/l

II Inkubationspuffer pH 7,0:

Zusammensetzung: 0,5 Mol/l Na_2HPO_4 -Lösung 32,2 ml
 0,5 Mol/l NaH_2PO_4 -Lösung 17,8 ml
 demineralisiertes Wasser ad 200,0 ml

Molarität: 0,125 Mol/l

III Inkubationspuffer pH 7,6:

Zusammensetzung: 0,5 Mol/l Na_2HPO_4 -Lösung 44,0 ml
 0,5 Mol/l NaH_2PO_4 -Lösung 6,0 ml
 demineralisiertes Wasser ad 200,0 ml

Molarität: 0,125 Mol/l

Tab. 6:

Verwendete Inkubationspuffer

(aus Rauen 1956).

Es wurden 1,8 ml der Pharmakonlösung in die Inkubationsseite eingefüllt. Die Pufferseite wurde mit 1,8 ml des isotonen Phosphatpuffers gefüllt. Die Dialyse wurde bei 4 °C und 12 U/min in einem Dianorm-Gerät durchgeführt. Nach dem Versuchsende wurde überprüft, ob sich der pH-Wert der Inkubationslösung verändert hatte.

Bei jedem Versuch wurde eine Kammer, die kein Gewebe enthielt, mitgeführt. Auf diese Weise konnte die Einstellung des Gleichgewichts zwischen den beiden Kammerhälften kontrolliert werden.

Die Bindung der Pharmaka an die Dialysemembran lag meist unter 10 Prozent. Für die Pharmaka Isotretinoin und Ketoconazol lag sie bei ca. 20 Prozent. Diese Angaben gelten für den Ansatz mit dem Gewebe und wurden folgendermaßen berechnet:

$$\% \text{ Membranbindung} = \left(1 - \frac{M_I + M_P + M_G}{M_T} \right) \cdot 100 \quad (\text{Gl. 5})$$

M_I = Gesamtpharmakonmenge in der Inkubationsseite

M_P = Gesamtpharmakonmenge in der Pufferseite

M_G = Gesamtpharmakonmenge im Gewebe

M_T = gesamte eingesetzte Pharmakonmenge

4.2. Entfettung des Gewebes für die Bindungsversuche:

Geräte: Gefriertrockner, Fa. Christ;

Schüttler;

Exsiccator.

Um den Einfluß der Gewebelipide auf die Bindung zu untersuchen, wurden die Epidermis- und Coriumproben vor

den Bindungsversuchen entfettet.

Die Hautfraktionen wurden bei -30°C eingefroren. Anschließend wurden sie 12 Stunden gefriergetrocknet, um bei der Extraktion eine Veränderung der Proteine zu vermeiden.

Nach der Gefriertrocknung wurden die Proben geteilt. Die eine Hälfte diente beim Bindungsversuch als Kontrolle, während die zweite Hälfte vorher extrahiert wurde. In Glaskolben wurden die Proben ($\bar{x} = 75 \text{ mg}$) einzeln mit 20 ml des Lösungsmittels versetzt. Als Lösungsmittel dienten n-Hexan bzw. ein Gemisch aus Chloroform-Methanol (2:1 V/V). Die Kolben wurden 4 Stunden lang bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach der Extraktion wurden die Proben aus den Kolben entfernt. Das verbliebene Lösungsmittel im Gewebe wurde bei -600 mm Hg (3 h) im Exsiccator entzogen. Die Kontrollen und die entfetteten Proben wurden anschließend im Inkubationspuffer (pH 7,0) gewässert. Die Bindungsversuche wurden dann wie unter 4.1. durchgeführt.

Aus dem Lipidextrakt wurde der Gehalt an Gesamtlipiden, wie in 5. beschrieben, bestimmt.

Für die Bindungsversuche an entfettetem Gewebe wurden pro Pharmakon Epidermis und Corium von nur einer Hautprobe untersucht. Damit konnten interindividuelle Unterschiede ausgeschlossen und so die Streuung gering gehalten werden.

4.3. Dauer der Dialyse:

Die Bindung an das Gewebe kann erst bestimmt werden, wenn sich ein Gleichgewicht zwischen den beiden Kammerhälften und dem Gewebe eingestellt hat.

Für Salicylsäure und Ketoconazol wurde die Dauer bis zur Einstellung des Gleichgewichts überprüft. Es ist bekannt, daß die Dauer bis zur Einstellung des Gleichgewichts bei der Dialyse vom Molekulargewicht des Pharmakons abhängt (Kurz et al. 1977). Darum wurden die Arzneistoffe mit dem niedrigsten (Salicylsäure) bzw. dem höchsten (Ketoconazol) Molekulargewicht der zehn verwendeten Arzneistoffe untersucht.

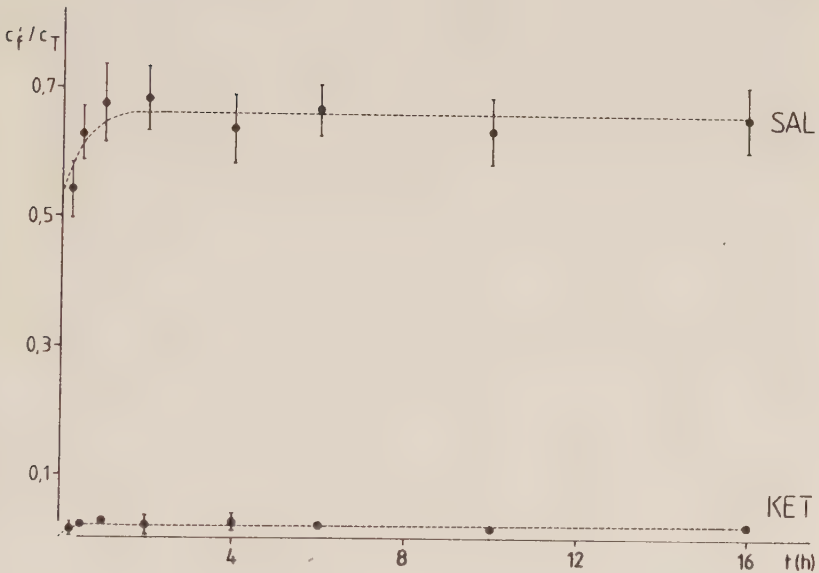


Abb. 18a:

Zeitverlauf bis zur Gleichgewichtseinstellung von Ketoconazol und Salicylsäure im Gewebe (c_T) und auf der Pufferseite (c_f'). Die Bestimmung wurde für die Epidermis durchgeführt ($\bar{x} \pm s$, $n=4$).

Bei diesem Versuch wurde die Konzentration des Pharmakons im Gewebe (c_T) und in der Pufferseite der Dialysenkammer (c_f') bestimmt. Die Versuche wurden für die Epidermis und das Corium über 16 Stunden durchgeführt. Das Gleichgewicht der beiden zu messenden Parameter stellte sich für Salicylsäure und für Ketoconazol nach ein bis zwei Stunden ein.

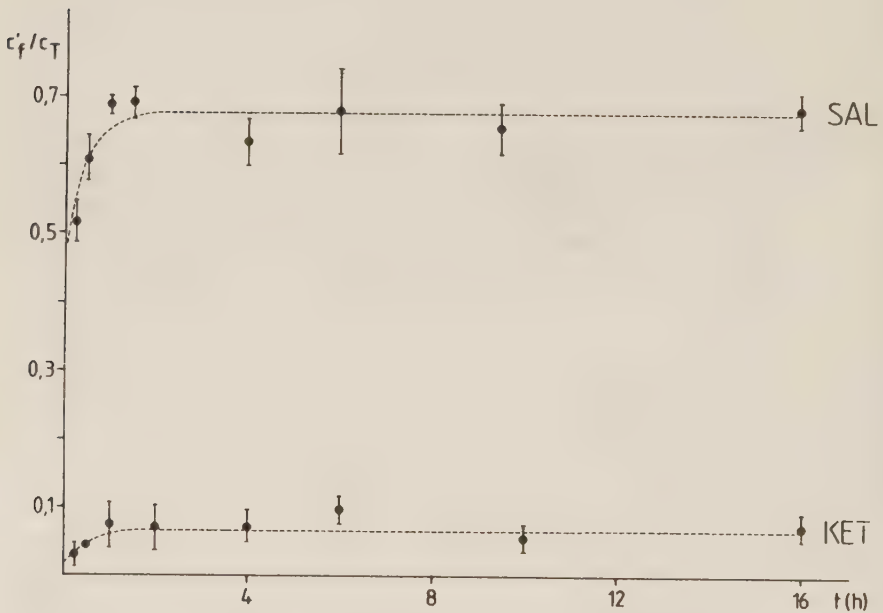


Abb. 18b:

Zeitverlauf bis zur Gleichgewichtseinstellung von Ketoconazol und Salicylsäure im Gewebe (c_T) und auf der Pufferseite (c_f'). Die Bestimmung wurde für das Corium durchgeführt ($\bar{x} \pm s$, $n=4$).

In Abb. 18a und 18b ist der Zeitverlauf der Messungen als Quotient der freien Konzentration (c_f') durch die Gewebekonzentration (c_T) angegeben.

Aus praktischen Gründen war die Versuchsdauer länger und lag bei ca. 15 Stunden.

4.4. Bestimmung des Wassergehaltes des Gewebes:

Geräte: Mettler B 6 Präzisionswaage, Fa. Spoerhase;
Trockenschrank, Fa. Kottermann.

Der Wassergehalt wurde aus der Differenz des Feuchtgewichts nach der Inkubation und dem Trockengewicht durch Wiegen bestimmt. Da der Wassergehalt zwischen den beiden Hautschichten und auch für die einzelnen Hautproben variierte, wurde er für jede inkubierte Probe bestimmt.

Durchführung:

Nach dem Öffnen der entleerten Dialysekammern wurden die Proben auf einem Filterpapier abgetupft. Sie wurden dann direkt in die Verbrennungshütchen für den Packard Sample Oxidizer eingewogen.

Die Verbrennungshütchen waren vorher bis zur Gewichtskonstanz bei 105 °C getrocknet und bis zur Verwendung in einem Exsiccator aufbewahrt worden. Nach der Einwaage wurden die bestückten Verbrennungshütchen bis zur Gewichtskonstanz eine Stunde bei 105 °C im Trockenschrank getrocknet.

Das direkte Einwiegen in die Verbrennungshütchen war notwendig, um beim Trocknen austretende Lipide aufzufangen. Pharmakamengen, die sich in diesen Gewebelipiden angereichert hatten, konnten so mitbestimmt werden.

4.5. Analytik der Pharmaka:

Zur Bestimmung der Bindung von Pharmaka an die geringen Gewebemengen mußten die verwendeten Pharmaka radioaktiv markiert sein.

Sie sind in Tab. 7 zusammengestellt.

PHARMAKON	Isotop	spez. Aktivität (Ci/mmol)	Reinheit (%)	Bezugsquelle
CLONIDIN	^3H	20,0	98	AB
DIAZEPAM	^{14}C	0,057	99	AB
IMIPRAMIN	^3H	23,0	95	AB
ISOTRETINOIN	^{14}C	0,0009	90	HR
KETOCONAZOL	^3H	0,44	98	J
PHENOBARBITAL	^3H	8,1	98	NEN
PHENYTOIN	^{14}C	0,055	97	AB
PROPRANOLOL	^3H	22,0	98	AB
SALICYLSÄURE	^{14}C	0,052	98	NEN
WARFARIN	^{14}C	0,049	98	AB

Tab. 7:

Benutzte radioaktiv markierte Pharmaka (Firmenangaben)

AB = Amersham Buchler; NEN = New England Nuclear;

HR = Hoffmann la Roche; J = Janssen;

4.5.1. Bestimmung der Pharmakonkonzentration in Flüssigkeiten:

Geräte: Szintillationszähler TRI CARB Modell 3385,
 Fa. Packard;
 Szintillationszähler 1215 Rackbeta II, Fa. LKB;
 Hewlett Packard HP 97.

Durchführung:

Die Menge an markierter Substanz wurde so gewählt, daß nach Versuchsende mindestens 1000 cpm pro 200 µl zu erwarten waren. Die Konzentration des markierten Pharmakons wurde durch Flüssigkeitsszintillationszählung bestimmt. Die 200 µl der zu messenden Lösung wurden 15 ml einer Szintillationsflüssigkeit zupipettiert (Tab. 8). Die Zählzeit wurde so vorgewählt, daß der relative Zählfehler unter 1,0 % lag.

Bei den Bindungsversuchen wurden jeweils drei Proben der Pufferseite (c_f') bestimmt und der Wert gemittelt. Von der Inkubationsseite wurde zur Kontrolle eine Probe entnommen und gezählt.

POPOP	1 g
PPO	20 g
Naphtalin	300 g
Methanol	50 ml
Ethylenglykol	100 ml
Dioxan	ad 5000 ml

Tab. 8:

Zusammensetzung der Dioxan-Szintillationsflüssigkeit.

POPOP = 1,4-bis-2-(Methyl-5-Phenoxazolyl)-Benzol

PPO = 2,5-Diphenyloxazol

Für die Messung der Konzentration von Pharmaka in Flüssigkeiten und im Gewebe (siehe 4.5.2.) wurden zwei verschiedene Szintillationsflüssigkeiten verwendet. Deshalb wurden die erhaltenen cpm in dpm umgerechnet.

4.5.2. Bestimmung der Pharmakonkonzentration im Gewebe:

Geräte: wie unter 4.5.1., zusätzlich

TRI CARB Sample Oxidizer B 306, Fa. Packard.

Die Messungen der Konzentration von Pharmaka im Gewebe wurde durch Verbrennen der Proben im Packard Sample Oxidizer möglich. Die markierten Pharmaka wurden bei dieser Verbrennung in $^{14}\text{CO}_2$ bzw. $^3\text{H}_2\text{O}$ übergeführt und dann durch Szintillationszählung die Konzentration bestimmt.

POPOP	0,83 g
PPO	8,3 g
Methanol	150 ml
Triton-X-100	200 ml
Xylol	650 ml

Tab. 9:

Zusammensetzung der Xylol-Szintillationsflüssigkeit.

POPOP = 1,4-bis-2-(Methyl-5-Phenoxazolyl)-Benzol

PPO = 2,5-Diphenyloxazol

Durchführung:

Vor der Verbrennung der Gewebeproben wurden mindestens drei Standards verbrannt, um die Funktion des Apparates zu überprüfen. Die Gewebeproben wurden dann in aufsteigender Reihe mit einer Verbrennungszeit von einer Minute verbrannt. Nach den Gewebeproben wurde ein weiterer Standard zur Funktionskontrolle verbrannt.

Das Verbrennungsprodukt der ^3H -markierten Pharmaka wurde in eine Xylol-Szintillationsflüssigkeit (Tab. 9) (15 ml) gespült. Bei den ^{14}C -markierten Pharmaka wurden zu den 15 ml Xylolszintillator zusätzlich 5 ml Carbo-sorb^R zugesetzt.

Die Proben wurden anschließend in einem Szintillationszähler gezählt. Die erhaltenen cpm wurden in dpm umgerechnet.

4.5.3. H P L C - Messungen:

Geräte: HPLC-Pumpe Constant Flow Pump 600/200,
 Fa. Gynkotec;
 Spektrophotometer SP-4, Fa. Gynkotec;
 UV-Integrator Chromatopac C-R 1B, Fa. Shimadzu;
 Radioaktivitäts-HPLC-Detektor LB 503,
 Fa. Berthold;
 Flüssigszintillatorzelle Z 200, Fa. Berthold;
 Feststoffsintillationszelle H 130, Fa. Berthold;
 Apple II Europlus Computer;

Die quantitative Bestimmung der Pharmaka in Flüssigkeiten und im Gewebe wurde mittels Szintillationszählung durchgeführt. Deshalb wurde durch HPLC-Messungen

für vier Pharmaka überprüft, ob die Arzneistoffe während der Inkubation nicht verändert wurden und sich die Messungen der Szintillationszählung auf die eingangs eingesetzten Substanzen beziehen.

Durchführung:

Die mobile Phase wurde gemischt, über einen Membranfilter filtriert und entgast. Es wurde die Inkubationsflüssigkeit vor der Dialyse und die Flüssigkeit aus der Pufferseite direkt eingespritzt. Der Radioaktivitätsdetektor und das UV-Spektrometer wurden gleichzeitig benutzt. Das Einspritzvolumen schwankte zwischen 100 μ l und 500 μ l. Die Messungen wurden für Epidermis und C¹⁴-Cortisol, die aus mehreren Hautproben stammten, durchgeführt.

Im folgenden sind die Analysenbedingungen für die gemessenen Pharmaka beschrieben.

Diazepam:

(modifiziert nach Brodie et al. 1978)

Säule: Fertigsäule Gynkochrom, ODS-Hypersil
(Länge 25 cm, Partikeldurchmesser 5 μ m),
Fa. Gynkotek;

Laufmittel: Methanol - Wasser (65 : 35)

Flußgeschwindigkeit: 1,5 ml/min

Wellenlänge UV-Detektor: 254 nm

Einspritzvolumen: 500 μ l

Imipramin:

(modifiziert nach Johnson et al. 1982)

Säule: Fertigsäule Gynkochrom, CPS-Hypersil

(Länge 12 cm, Partikeldurchmesser 5 μm),

Fa. Gynkotec;

Laufmittel: Acetonitril - Acetatlösung (pH 7,0; 0,03 Mol/l)

(70 : 30)

Flußgeschwindigkeit: 1 ml/min

Wellenlänge UV-Detektor: 254 nm

Einspritzvolumen: 100 μl

Ketoconazol:

(modifiziert nach Alton 1980)

Säule: siehe Imipramin

Laufmittel: Acetonitril - KH_2PO_4 -Lösung (0,05 M mit

0,1 N NaOH auf pH 6,0 eingestellt)

(35 : 65)

Flußgeschwindigkeit: 1,5 ml/min

Wellenlänge UV-Detektor: 205 nm

Einspritzvolumen: 500 μl

Phenobarbital:

(modifiziert nach Koizumi et al. 1981)

Säule: siehe Diazepam

Laufmittel: Methanol - Citronensäurelösung 0,1 %,

(eingestellt auf pH 6,2) (1 : 1)

Flußgeschwindigkeit: 1 ml/min

Wellenlänge UV-Detektor: 254 nm

Einspritzvolumen: 100 μl

4.6. Auswertung der Ergebnisse:

Die gebundene Konzentration (c_b) des Pharmakons läßt sich nicht direkt messen. Sie wird aus der Differenz der

Gesamtkonzentration (c_T) im Gewebe und der freien Pharmakonkonzentration (c_f) im Gewebewasser berechnet.

$$c_b = c_T - c_f \quad (\text{Gl. 6})$$

Die totale Konzentration c_T (Mol/kg) ist definiert durch die Pharmakonmenge (Mol) im Gewebe dividiert durch das Feuchtgewicht (kg).

Die freie Konzentration c_f (Mol/kg) ist der Quotient aus der im Gewebewasser freien Pharmakonmenge (Mol) und dem Gewicht des Gewebewasseranteils (kg).

Die Bestimmung der Konzentration aus der Pufferseite der Dialysekammern (c_f') berücksichtigt nicht, daß sich das freie Pharmakon nur im Gewebewasserraum verteilen kann. Mit dem Trockengewicht T (%) kann berechnet werden, wie groß der Wasseranteil am ganzen Gewebe ist. Damit kann die freie Konzentration (c_f) folgendermaßen berechnet werden:

$$c_f = c_f' \cdot \left(1 - \frac{T}{100} \right) \quad (\text{Gl. 7})$$

Durch Einsetzen von Gleichung 7 in Gleichung 6 läßt sich die gebundene Konzentration (c_b) aus der totalen Konzentration (c_T), der Konzentration in der Pufferseite (c_f') und dem Trockengewicht berechnen.

$$c_b = c_T - c_f' \cdot \left(1 - \frac{T}{100} \right) \quad (\text{Gl. 8})$$

Der gebundene Prozentsatz (% B) des Pharmakons wurde folgendermaßen berechnet:

$$\% B = \frac{c_b}{c_T} \cdot 100 \quad (\text{Gl. 9})$$

5. Bestimmung des Gesamtlipidgehaltes der Gewebeproben:

Geräte: Spektralphotometer PMQ 3, Fa. Zeiss;
 1 cm Glasküvetten;
 Rotavapor^R, Fa. Büchi;
 Mikropipette "Micromann" M250, Fa. Abimed;
 Schüttler; Exsiccator; Wasserbad.

Durchführung:

Die Epidermis- und Coriumproben wurden bei 4 °C, -600 mm Hg im Exsiccator unter Lichtschutz bis zur Gewichtskonstanz (96 h) getrocknet. Von den trockenen Proben wurden ca. 10 mg in 15 ml Schliffkolben eingewogen. In die Schliffkolben wurden 10 ml eines Chloroform-Methanol-Gemisches (2:1 V/V) eingefüllt und verschlossen. Auf Grund der geringen Gewebemengen die zur Verfügung standen, konnten die Proben nicht homogenisiert werden.

In Vorversuchen konnte gezeigt werden, daß eine einmalige Extraktion ausreicht. Mit einer zweiten Extraktion wurden nur 1 % weitere Lipide extrahiert. Die Extraktion der Lipide aus dem Gewebe dauert ca. eine Stunde (Abb. 19).

Die Kolben wurden auf einem Schüttler 4 Stunden lang bewegt. Nach dem Ende der Extraktion wurden die Gewebeteilchen mit einer Pinzette aus dem Kolben entfernt. Das Extraktionsgemisch wurde bei Raumtemperatur mit dem Rotavapor^R abgedampft. Die Kolben wurden mit Stickstoff begast, um restliches Lösungsmittel auszutreiben.

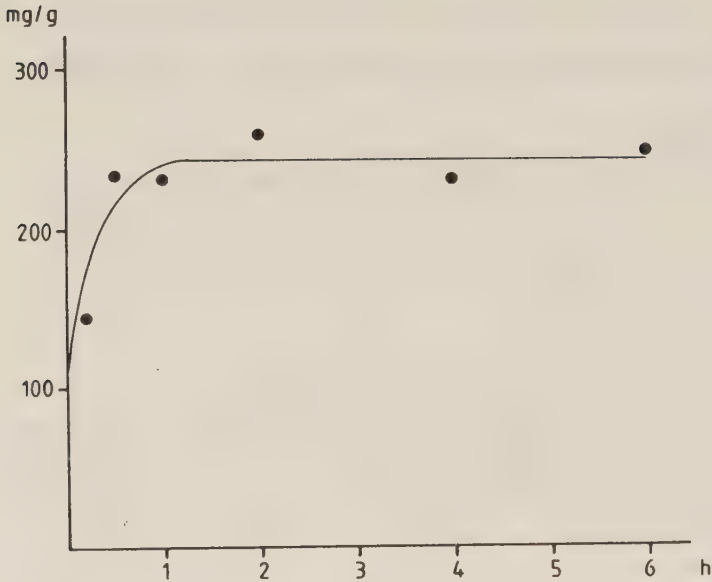


Abb. 19:

Zeitverlauf der Lipidextraktion aus Epidermisgewebe.

Der Gehalt an extrahierten Lipiden wurde mit der Sulpho-Phospho-Vanillin-Reaktion nach Zöllner und Kirsch (1962) mit Fertigreagenzien (Merckotest^R Gesamtlipide, Fa. Merck) bestimmt.

Die Extinktion wurde bei 530 nm gemessen. Der Gesamtlipidgehalt des Trockengewebes wurde folgendermaßen berechnet:

$$\text{Gesamtlipidgehalt mg/g} = \frac{E_p}{E_s} \cdot \frac{G_s}{G_p} \cdot 10 \quad (\text{Gl. 10})$$

E_p = Extinktion der Probe

E_s = Extinktion des Standards

G_p = Einwaage der Probe in mg

G_s = Einwaage des Standards in mg

Von jeder Probe wurden drei Bestimmungen durchgeführt und der Wert gemittelt.

6. Bestimmung des Stickstoffgehaltes der Proben:

Geräte: Kjelttec auto 1030 Analyzer, Fa. Tecator;

Kjelttec Aufschlußsystem DS 12, Fa. Tecator;

Durchführung:

Die Bestimmung des Stickstoffgehaltes von Epidermis und Corium wurde mit der Halbmikrokjeldahl-Methode durchgeführt.

Von den trockenen Proben wurden ca. 10 mg in die Aufschlußreagenzgläser eingewogen. Zu den Proben wurde ein Aufschlußgemisch (0,75 g K_2SO_4 und 3,75 mg Selen) und 2 ml konzentrierte Schwefelsäure gegeben. Der Ansatz wurde bei 400 °C in einem Glühblock erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden 6 ml demineralisiertes Wasser zugegeben. Die Proben wurden dann im Kjelttec^R-Apparat mit 0,1 N Salzsäure titriert.

Als Standard wurden pro Ansatz 3 mal 100 µl einer 2 %igen Ammoniumsulfat-Lösung mitbestimmt.

$$\% \text{ Stickstoff} = \frac{V_p}{V_s} \cdot \frac{0,424 \cdot *}{\text{Einwaage der Probe}} \cdot 100 \quad (\text{Gl. 11})$$

V_p = ml verbrauchte 0,1 N Salzsäure für die Probe

V_s = ml verbrauchte 0,1 N Salzsäure für den Standard

* = Stickstoffgehalt (mg) von 100 µl der 2 %igen
Ammoniumsulfat-Lösung

7. Bestimmung des Proteingehaltes in Lösungen:

Geräte: Spektralphotometer PMQ 3, Fa. Zeiss

1 cm Glasküvetten

Laborzentrifuge, Fa. Christ.

Durchführung:

Die quantitative Proteinbestimmung erfolgte durch die Biuret-Reaktion mit Fertigreagenzien (Merckotest^R Gesamteiweiß, Fa. Merck).

Die Messung wurde bei einer Absorption von 546 nm durchgeführt.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration der Inkubationsflüssigkeit wurden die Proben vor der Analyse bei 3000 g 5 Minuten zentrifugiert.

8. Bestimmung des Verteilungskoeffizienten:

8.1. Oktanol und Heptan:

Geräte: verschraubbare Reagenzgläser, Fa. Pyrex;

Laborzentrifuge, Fa. Christ;

Schüttler.

Durchführung:

Die Verteilung eines Pharmakons zwischen wäßriger und organischer Phase wurde bei pH 7,0 durchgeführt. Die wäßrige Phase war oktanol- bzw. heptangesättigt und die organischen Lösungsmittel puffergesättigt. Die Pharmaka wurden im Puffer zu einer Konzentration von 10^{-5} Mol/l gelöst und zusammen mit der Lösungsmittelphase zwei Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Die beiden Phasen wurden dann durch Zentrifugieren (3000 g) getrennt. Aus der organischen und aus der wäßrigen Phase wurde der Gehalt des Pharmakons bestimmt. Aus Gründen der Meßgenauigkeit war das Volumenverhältnis beider Phasen nicht immer gleich.

Der Verteilungskoeffizient wurde folgendermaßen berechnet:

$$\text{Verteilungskoeffizient} = \frac{V_W \cdot c_L}{V_L \cdot c_W} \quad (Gl. 12)$$

V_W = Volumen der Wasserphase

V_L = Volumen der Lipidphase

c_W = Konzentration des Pharmakons in der Wasserphase nach der Verteilung

c_L = Konzentration des Pharmakons in der Lipidphase nach der Verteilung

8.2. Extrahiertes Hautfett:

Geräte: wie unter 8.1., zusätzlich

Gyratory Water Bath Shaker G 76, Fa. New Brunswick Sci. Co;

Die Bestimmung des Verteilungskoeffizienten der Pharmaka

zwischen extrahiertem Hautfett und der Pufferphase wurde wie unter 8.1. durchgeführt.

Da das extrahierte Fett bei Raumtemperatur zu viskos ist und sich nicht durchmischen läßt, wurden die Versuche bei 37 °C durchgeführt.

Anschließend wurden die Proben bei 3000 g 15 Minuten zentrifugiert. Trotz der grenzflächenaktiven Bestandteile des Lipidextraktes (Cholesterin u.a.) war dies ausreichend um eine klare Phasentrennung zu erhalten. Die Pharmaka wurden bei diesen Versuchen zu einer Konzentration von 10^{-6} Mol/l im Puffer gelöst.

8.2.1. Extraktion des Hautfettes zur Bestimmung des Verteilungskoeffizienten:

Geräte: 100 ml Soxhlett;

Laborzentrifuge, Fa. Runne;

Rotavapor^R, Fa. Büchi;

"Pilz"-Heizhaube.

Das Hautfett zur Bestimmung des Verteilungskoeffizienten wurde aus sechs verschiedenen Hautproben extrahiert. Da die Epidermis nur in geringen Mengen vom Corium zu isolieren ist, konnten keine getrennten Extraktionen durchgeführt werden. Daher wurde das Fett aus der Gesamthaut (Epidermis und Corium) extrahiert.

Durchführung:

Von den Hautschichten wurde das Unterhautfettgewebe entfernt. Die präparierte Haut wurde klein geschnitten und in eine Soxhletthülse gegeben. In einem Soxhlett wurde

die Haut 6 Stunden lang mit 100 ml eines Chloroform-Methanol-Gemisches (2:1 V/V) extrahiert.

Nach dem Extraktionsende wurden 25 ml demineralisiertes Wasser zugegeben und durchmischt. Das Gemisch wurde 15 Minuten mit 1000 g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die obere Phase wurde abgesaugt und verworfen. Die verbliebene Chloroformphase wurde am Rotavapor^R eingedampft.

Der Extrakt wurde mit Stickstoff begast und lichtgeschützt bei -30 °C aufbewahrt.

8.2.2. Dünnschichtchromatographie des Lipidextraktes:

Geräte und Materialien: DC-Kammer;

DC-Fertigplatten Kieselgel 60 (Schichtdicke 0,25mm) ohne Fluoreszenzindikator, Fa. Merck.

Durchführung:

Die qualitative Zusammensetzung der extrahierten Hautlipide wurde mittels Dünnschichtchromatographie bestimmt. Dazu wurden ein unpolares (A) und ein polares (B) Laufmittel verwendet. Die Detektion erfolgte mit Chromschwefelsäure und Molybdatophosphorsäure Sprühreagenz 3,5 %, Fa. Merck.

Laufmittel A:

Petrolether	-	Diethylether	-	Eisessig
90	:	10	:	1

Laufmittel B:

Chloroform	-	Methanol	-	Wasser
60	:	35	:	8

8.2.3. Bestimmung des Phosphatgehaltes des Lipidextraktes:

Geräte: Spektralphotometer PMQ 3, Fa. Zeiss;
1 cm Glasküvetten;

Durchführung:

Die Bestimmung des Phosphatgehaltes wurde nach Bartlett (1959) durchgeführt. Die Extinktion der Proben wurde im Spektralphotometer bei 623 nm gemessen.

9. Rechnerische Auswertung und Darstellung der Daten:

Geräte: Hewlett Packard HP 97;
Olivetti P 6060;

Durchführung:

Die statistischen Methoden und Bezeichnungen wurden aus Sachs (1984) entnommen.

Die Mittelwerte ($\bar{x}$) in den Abbildungen und Tabellen wurden mit dem Standardfehler des arithmetischen Mittels $s_{\bar{x}}$ ("Standard Error") angegeben.

Zum Vergleich von zwei Mittelwerten wurde - je nach Versuchsbedingungen - der t-Test für gepaarte oder ungepaarte Werte durchgeführt. Die Beurteilung des Unterschieds mehrerer Mittelwerte erfolgte mit Hilfe des H-Tests nach Kruskal-Wallis.

Zur Prüfung des Zusammenhangs zweier Parameter diene der Korrelationskoeffizient (r) oder der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman (r_s).

Ein Zusammenhang wurde als signifikant bezeichnet, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit p kleiner als 0,05 war.

E. T A B E L L E N A N H A N G

PHARMAKON	n	EPIDERMIS		CORIUM	
		% B $\pm$ $s_{\bar{x}}$	B/F	% B $\pm$ $s_{\bar{x}}$	B/F
CLONIDIN	8	68,46 $\pm$ 2,8	2,25	32,01 $\pm$ 3,03	0,49
DIAZEPAM	12	93,73 $\pm$ 0,97	18,56	85,88 $\pm$ 2,6	9,35
IMIPRAMIN	10	94,52 $\pm$ 0,44	18,45	83,09 $\pm$ 0,98	5,09
ISOTRETINOIN	8	99,51 $\pm$ 0,05	225,52	97,89 $\pm$ 0,36	55,56
KETOCONAZOL	10	98,24 $\pm$ 0,27	64,29	94,04 $\pm$ 0,59	17,02
PHENOBARBITAL	10	62,27 $\pm$ 1,19	1,67	46,52 $\pm$ 1,72	0,88
PHENYTOIN	11	90,43 $\pm$ 0,72	10,66	84,34 $\pm$ 1,08	5,7
PROPRANOLOL	8	91,81 $\pm$ 0,58	12,02	75,63 $\pm$ 0,96	3,18
SALICYLSÄURE	9	40,64 $\pm$ 5,04	0,77	46,01 $\pm$ 2,99	0,91
WARFARIN	8	83,51 $\pm$ 1,38	5,35	75,45 $\pm$ 1,03	3,11

Tab. 1:

Bindung von Pharmaka an Epidermis und Corium.

% B: gebundener Anteil in Prozent

B/F: Quotient aus gebundenem und freiem Anteil

EPIDERMIS CORIUM

	r	k	m	r	k	m
IMTPRAMIN	0,99	9,56	0,98 $\pm$ 0,01	0,99	2,82	0,97 $\pm$ 0,01*
KETOCONAZOL	0,98	22,08	0,97 $\pm$ 0,05	0,99	11,93	0,99 $\pm$ 0,03
PHENOBARBITAL	0,99	1,96	1,02 $\pm$ 0,01	0,99	0,74	1,00 $\pm$ 0,01
PROPRANOLOL	0,99	3,51	0,94 $\pm$ 0,01**	0,99	1,22	0,96 $\pm$ 0,01**
SALICYLSÄURE	0,98	0,58	0,99 $\pm$ 0,04	0,99	0,55	0,98 $\pm$ 0,03
WARFARIN	0,99	4,08	1,00 $\pm$ 0,02	0,99	1,38	0,96 $\pm$ 0,02

* = $p < 0,05$ ** = $p < 0,01$ Tab. 2:

Zusammenstellung der Parameter m und k der Freundlich Isothermen ($c_b = k \cdot c_f^m$). Die Werte für m und k wurden durch lineare Regression in doppellogarithmischer Darstellung ermittelt (r = Korrelationskoeffizient). Die Parameter wurden aus 4-6 Versuchen berechnet.

	pH 6,4	pH 7,0	pH 7,6
<u>Clonidin:</u>			
% ionisiert	98,6	94,67	81,7
% B-Epidermis	69,12 $\pm$ 1,5	69,88 $\pm$ 1,8	70,76 $\pm$ 1,3
% B-Corium	31,2 $\pm$ 3,78	32,61 $\pm$ 4,05	30,6 $\pm$ 2,82
<u>Diazepam:</u>			
% ionisiert	0,08	0,02	0,005
% B-Epidermis	95,27 $\pm$ 0,38	95,29 $\pm$ 1,29	94,96 $\pm$ 2,26
% B-Corium	89,77 $\pm$ 2,2	90,64 $\pm$ 3,8	89,91 $\pm$ 3,7
<u>Isotretinoin:</u>			
% ionisiert	99,74	99,93	99,98
% B-Epidermis	99,68 $\pm$ 0,06	99,41 $\pm$ 0,05	99,43 $\pm$ 0,05
% B-Corium	97,45 $\pm$ 0,38	97,08 $\pm$ 0,34	96,45 $\pm$ 0,55
<u>Ketoconazol:</u>			
% ionisiert	56,29	24,44	7,51
% B-Epidermis	97,56 $\pm$ 0,12*	98,91 $\pm$ 0,12	99,02 $\pm$ 0,33
% B-Corium	93,9 $\pm$ 1,27	94,56 $\pm$ 0,77	96,28 $\pm$ 0,66
<u>Phenobarbital:</u>			
% ionisiert	11,18	33,38	66,61
% B-Epidermis	65,25 $\pm$ 2,18	63,18 $\pm$ 2,4	60,13 $\pm$ 3,96
% B-Corium	52,77 $\pm$ 1,58	50,5 $\pm$ 1,4	47,27 $\pm$ 2,83
<u>Phenytoin:</u>			
% ionisiert	1,16	4,46	15,69
% B-Epidermis	90,91 $\pm$ 0,54	89,27 $\pm$ 1,7	90,15 $\pm$ 1,16
% B-Corium	83,17 $\pm$ 1,2	81,95 $\pm$ 1,3	81,09 $\pm$ 1,69

Tab. 3:

pH-Abhängigkeit der Bindung an Epidermis und Corium
($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$; n=4-6).

* = $p < 0,01$

	EPIDERMIS	CORIUM
<u>ISOTRETINOIN</u>		
<u>Oberschenkelhaut:</u>		
% B	99,51 $\pm$ 0,1	**98,62 $\pm$ 0,02
B/F	199,09 $\pm$ 28,8	64,46 $\pm$ 4,75
<u>Bauchhaut:</u>		
% B	99,33 $\pm$ 0,09	95,19 $\pm$ 0,64
B/F	153,63 $\pm$ 28,8	22,73 $\pm$ 0,76
<u>Rückenhaut:</u>		
% B	99,41 $\pm$ 0,04	95,09 $\pm$ 1,34
B/F	168,81 $\pm$ 14,1	23,36 $\pm$ 7,9
<u>KETOCONAZOL</u>		
<u>Oberschenkelhaut:</u>		
% B	98,73 $\pm$ 0,2	*95,21 $\pm$ 0,11
B/F	74,42 $\pm$ 8,86	20,04 $\pm$ 0,52
<u>Bauchhaut:</u>		
% B	98,98 $\pm$ 0,14	94,64 $\pm$ 0,18
B/F	99,88 $\pm$ 14,6	17,73 $\pm$ 0,64
<u>Rückenhaut:</u>		
% B	99,06 $\pm$ 0,31	93,61 $\pm$ 0,23
B/F	108,71 $\pm$ 26,1	14,68 $\pm$ 0,53

Tab. 4:

Vergleich der Bindung von Isotretinoin und Ketoconazol an die Oberschenkel-, Bauch- und Rückenhaut einer Person ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$; n=3).

* = $p < 0,05$ ** = $p < 0,01$

	<u>unbehandelt</u>		<u>entfettet</u>		
	%	B/F	HEXAN		METHANOL/CHLOROFORM
			%	B/F	%
<u>DIAZEPAM</u>					
Epidermis	97,1 $\pm$ 0,18	33,57 $\pm$ 2,16	94,46 $\pm$ 0,17	16,78 $\pm$ 0,29***	95,9 $\pm$ 0,18
Corium	93,36 $\pm$ 0,26	20,72 $\pm$ 1,23	82,6 $\pm$ 1,6	4,96 $\pm$ 0,61**	23,44 $\pm$ 1,05***
<u>ISOTRETINOIN</u>					
Epidermis	99,42 $\pm$ 0,05	179,31 $\pm$ 10,3	99,42 $\pm$ 0,03	174,9 $\pm$ 10,04	85,18 $\pm$ 1,23
Corium	97,53 $\pm$ 0,08	39,58 $\pm$ 1,23	95,97 $\pm$ 0,49	24,64 $\pm$ 3,02*	5,89 $\pm$ 0,38**
<u>KETOCONAZOL</u>					
Epidermis	98,4 $\pm$ 0,09	62,25 $\pm$ 3,61	98,86 $\pm$ 0,11	87,95 $\pm$ 7,82*	92,19 $\pm$ 10,1*
Corium	96,09 $\pm$ 0,36	25,05 $\pm$ 2,09	95,31 $\pm$ 0,32	20,8 $\pm$ 1,4	36,87 $\pm$ 3,28*
<u>PHENYTOIN</u>					
Epidermis	93,56 $\pm$ 0,24	14,62 $\pm$ 0,85	93,69 $\pm$ 0,53	15,09 $\pm$ 1,48	
Corium	85,21 $\pm$ 1,84	5,97 $\pm$ 0,81	84,6 $\pm$ 2,58	5,82 $\pm$ 0,98	

Tab. 5:

Bindung von vier Pharmaka an entfettete Epidermis- und Coriumproben ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$; n=3-6).
 * = p < 0,05 ** = p < 0,01 *** = p < 0,001 (signifikanter Unterschied
 im Vergleich zur Bindung an die unbehandelte Probe)

	<u>ISOTRETINOLIN</u>	<u>KETOCONAZOL</u>	<u>DIAZEPAM</u>
<u>Schnitttiefe:</u>			
<u>200 μm:</u>			
% B	98,57 $\pm$ 0,28**	95,52 $\pm$ 0,38	94,67 $\pm$ 0,6
B/F	75,76 $\pm$ 10,8	21,62 $\pm$ 1,82	18,64 $\pm$ 1,71
<u>400 μm:</u>			
% B	95,52 $\pm$ 0,38	96,48 $\pm$ 0,26	94,71 $\pm$ 0,73
B/F	19,68 $\pm$ 3,2	27,8 $\pm$ 2,28	18,14 $\pm$ 2,29
<u>600 μm:</u>			
% B	95,2 $\pm$ 0,71	96,2 $\pm$ 0,19	93,17 $\pm$ 0,24*
B/F	20,64 $\pm$ 3,3	25,17 $\pm$ 1,49	13,67 $\pm$ 0,5

Tab. 6:

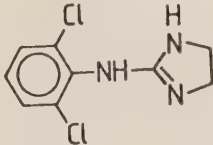
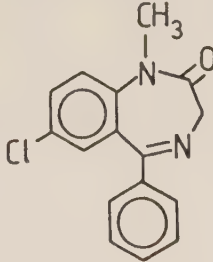
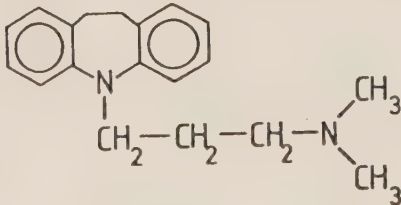
Bindung von Pharmaka an das Corium aus unterschiedlicher

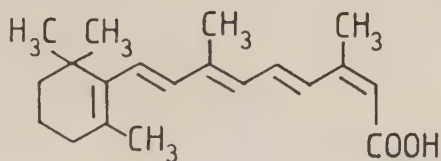
Schnitttiefe ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$; n=3).

* = p < 0,05 ** = p < 0,01

Tab. 7:

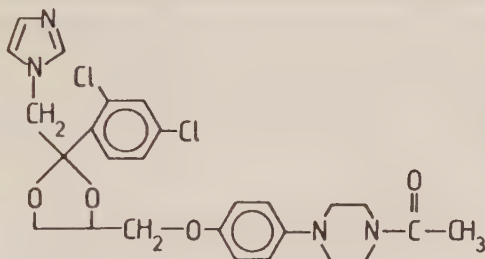
Übersicht über die verwendeten Substanzen.

FORMEL INN-BEZEICHNUNG (SALZ)	MOLEKULARGEWICHT (SALZ)	BEZUGSQUELLE
 CLONIDIN (CLONIDIN-HCL)	230,1 (266,6)	Boehringer Ingelheim
 DIAZEPAM	284,4	Hoffmann-La Roche Grenzach-Wyhlen
 IMIPRAMIN (IMIPRAMIN-HCL)	280,4 (316,9)	Geigy Wehr



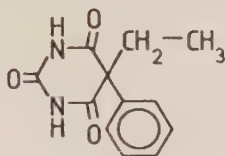
ISOTRETINOIN

300,4

Hoffmann-La Roche
Grenzach-Wyhlen

KETOCONAZOL

531,4

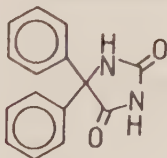
Janssen
Neuss

PHENOBARBITAL

232,2

(PHENOBARBITAL-NA)

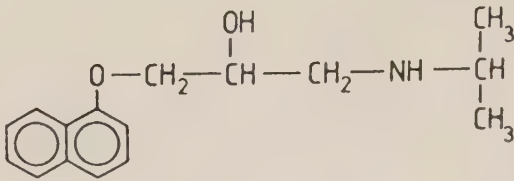
(254,2)

Bayer
Leverkusen

PHENYTOIN

252,3

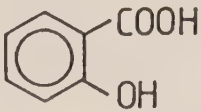
Nordmark
Uetersen



PROPRANOLOL
(PROPRANOLOL-HCL)

259,1
(295,6)

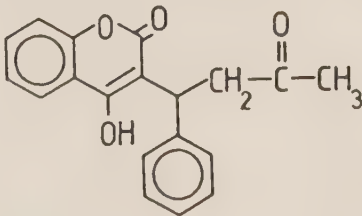
ICI
Plankstadt



SALICYLSÄURE

138,1

Merck
Darmstadt



WARFARIN
(WARFARIN-NA)

308,1
(330,1)

Merrell
Rüsselsheim

F. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit gingen wir der Frage nach, ob die menschliche Haut (Epidermis und Corium) in vitro Pharmaka bindet und durch welche Faktoren diese Bindung beeinflusst wird. Da sich Epidermis und Corium in ihrer Zusammensetzung unterscheiden, wurden die zwei Hautschichten getrennt untersucht.

Die Epidermis wurde durch die Saugblasenmethode vom Corium getrennt. Das verwendete Corium wurde als 0,2 mm dicke Scheibe durch Schneiden mit einem Gefriermikrotom vom restlichen Corium abgetrennt. Die Hautschichten wurden dann einzeln in einer gepufferten Pharmakonlösung bis zur Einstellung des Gleichgewichts inkubiert. Durch Bestimmen der Konzentration der Pharmaka im Gewebe und der freien Konzentration durch Dialyse konnte die Bindung berechnet werden.

Für die Bindung von Pharmaka an Epidermis und Corium ergaben sich folgende Ergebnisse:

- 1) Alle verwendeten Pharmaka (fünf Säuren und fünf Basen) wurden an Epidermis und Corium gebunden.
- 2) Für neun der zehn Pharmaka war die Epidermisbindung signifikant höher als die Coriumbindung.
- 3) Die Bindung von sechs untersuchten Pharmaka an die beiden Hautschichten war weitgehend unabhängig vom pH-Wert der Inkubationslösung (pH 6,4 bis pH 7,6) und von der eingesetzten Pharmakonkonzentration (10^{-7} Mol/l bis 10^{-3} Mol/l).
- 4) Die Bindung an Epidermis und Corium war deutlich abhängig von der Lipophilie der verwendeten Pharmaka.

Die Lipophilie wurde als Lipid-Wasser-Verteilungskoeffizient mit drei Lipidphasen unterschiedlicher chemisch-physikalischer Eigenschaften bestimmt (Heptan, Hautfett, Oktanol). Der beste Zusammenhang zwischen der Bindung an Epidermis und Corium und der Lipophilie der Pharmaka wurde für den Oktanol-Verteilungskoeffizienten der unionisierten Substanz ermittelt.

5) Die Bindung einiger Pharmaka konnte von inter-individuell variierenden Parametern für das Gewebe (Gesamtlipid-, Stickstoffgehalt) abhängen.

6) Die Lipide der beiden Hautschichten können die Bindung in geringem Ausmaß beeinflussen. Für die teilweise sehr hohe Bindung an Epidermis und Corium kommen aber andere Gewebebestandteile (z.B. Proteine) in Betracht.

7) Die Bindung der Pharmaka an das Corium kann von der Lokalisation der Entnahmestelle sowie unterschiedlicher Schnittiefe beeinflußt werden. Für die Epidermis war kein Einfluß auf die Bindung in Abhängigkeit der Lokalisation der Entnahmestelle zu finden.

8) Zwischen der Bindung von Pharmaka an die beiden Hautschichten und an andere Gewebe besteht ein guter Zusammenhang. Für die Epidermisbindung ist bei diesen Vergleichen durchweg ein besserer Zusammenhang zu finden als für die Coriumbindung.

9) Dagegen läßt sich bei einem Vergleich der Pharmakonbindung an die untersuchten Hautschichten mit der Plasmabindung ein schwacher Zusammenhang für die

Epidermisbindung und ein besserer für die Coriumbindung feststellen.

10) Für fünf Pharmaka ließ sich zeigen, daß zwischen der in vitro bestimmten Bindung und in vivo gemessenen Hautkonzentrationen ein enger Zusammenhang besteht.

11) Die Haut kann durch ihre große Masse und ihre Bindungseigenschaften einen bedeutenden Einfluß auf die Verteilung von Pharmaka im Organismus haben. Verglichen mit sechs anderen menschlichen Organen und dem Plasma, zeigt sich auf Grund von in vitro Daten, daß der Haut nach dem Muskelgewebe die zweitgrößte Bedeutung als Verteilungsorgan zukommt.

G. LITERATURVERZEICHNIS

K. Adachi

Receptor proteins for androgen in hamster sebaceous glands
J. Invest. Dermatol. 62: 217 - 223 (1974)

M. Adamčíč, M. Frišer-Herman

Über Veränderungen der chemischen Zusammensetzung der
menschlichen Haut während des Kindesalters
Arch. klin. exp. Derm. 229: 7 - 19 (1967)

H.R. Adams, A.A. Manian, M.L. Steenberg, J.P. Buckley
Effects of promazine and chlorpromazine metabolites on
the cornea

The phenothiazines and structurally related drugs

I.S. Forrest, C.J. Carr, E. Usdin

Raven Press - New York (1974)

M.J. Ainsworth

Methods for measuring percutaneous absorption
J. Soc. Cosm. Chem. 11: 69 - 78 (1960)

K.B. Alton

Determination of the antifungal agent, ketoconazole, in
human plasma by high-performance liquid chromatography
J. Chromatogr. 221: 337 - 344 (1980)

A.K. Appiah

Eignung verschiedener Verteilungsmodelle zur Beurteilung
der Permeabilität biologischer Membranen für Arzneimittel
Dissertation, Universität München (1971)

M. Artuc, C. Reinhold, G. Stüttgen, J. Gazith

A rapid method for measuring drug enrichment in epidermis
Arch. Dermatol. Res. 268: 129 - 140 (1980)

M. Artuc, G. Stüttgen, W. Schalla, H. Schaefer, J. Gazith
Reversible binding of 5- and 8-methoxypsoralen to human
serum proteins (albumin) and to epidermis in vitro
Brit. J. Der. 101: 669 - 677 (1979)

J.R.J. Baker, R.A. Christian, P. Simpson, A.M. White
The binding of topically applied glucocorticoids to rat skin
Brit. J. Derm. 96: 171 - 178 (1977)

H. Balzer, M. Makinose, W. Fiehn, W. Hasselbach
The binding of the calcium transport inhibitors reserpine,
chlorpromazine and prenylamine to the lipids of the
membranes of the sarcoplasmatic reticulum
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 260: 456 - 473 (1968)

G.R. Bartlett
Phosphorus assay in column chromatography
J. Biol. Chem. 234: 466 - 468 (1959)

J.P. Baumberger, V. Suntzeff, E.W. Cowdry
Methods for the separation of epidermis from dermis and
some physiologic and chemical properties of isolated
epidermis
J. Nat. Cancer Inst. 2: 413 - 423 (1942)

M.H. Bickel
The role of adipose tissue in the distribution and
storage of drugs
Prog. Drug Res. 28: 273 - 303 (1984)

M.H. Bickel, R. Gerny
Drug distribution as a function of binding competition.
Experiments with the distribution dialysis technique
J. Pharm. Pharmacol. 32: 669 - 674 (1980)

K.B. Bischoff, R.L. Dedrick

Thiopental pharmacokinetics

J. Pharm. Sci. 57: 1346 - 1351 (1968)

T. Björnheden, O. Wiklund, R. Bergstrand, O. Bondjers

Skin cholesterol and DNA in young patients with myocardial infarction

Acta Med. Scand. 207: 271 - 277 (1980)

M.S. Blois

Melanin binding properties of iodoquine

J. Invest. Dermatol. 50: 250 - 253 (1968)

M.S. Blois, L. Taskovich

The reversible binding of some aromatic and cyclic compounds to biopolymers in vitro

J. Invest. Dermatol. 53: 344 - 350 (1969)

R.R. Brodie, L.F. Chasseaud, T. Taylor

High-performance liquid chromatography determination of benzodiazepines in human plasma

J. Chromatogr. 150: 361 - 366 (1978)

R.L. Bronaugh, E.R. Congdon

Percutaneous absorption of hair dyes: Correlation with partition coefficients

J. Invest. Dermatol. 83: 124 - 127 (1984)

J.W. Coffey, V.J. Mattaliano, C. Fiedler-Nagy,

A.C. Sullivan

Collagen composition of the skin from obese and lean Zucker rats

Proc. Soc. exp. Biol. Med. 157: 435 - 439 (1978)

L.C. Craig, A. Ansevin

Dialysis studies. VI. Experiments with amino acids

Biochemistry 2: 1268 - 1271 (1963)

S.H. Curry

Theoretical changes in drug distribution resulting from changes in binding to plasma proteins and to tissue
J. Pharm. Pharmacol. 22: 753 - 757 (1970)

U.G. Dalvi, J.L. Zatz

Effect of skin binding on percutaneous transport of benzocaine from aqueous suspensions and solutions
J. Pharm. Sci. 71: 824 - 826 (1982)

L. Della Corte, G.P. Sgaragli

Tissue distribution of chlorimipramine and its demethylated metabolite after a single dose in the rat
Pharmacol. Res. Comm. 16: 207 - 213 (1984)

T. Deguchi, A. Ishii, M. Tanaka

Binding of aminoglycoside antibiotics to acidic mucopolysaccharides
J. Antibiot. 31: 150 - 155 (1978)

J.J. Di Giovanna, R.T. Fletcher, G.J. Chader

Qualitative and quantitative analysis of cytosol retinoid binding proteins in human skin
J. Invest. Dermatol. 85: 460 - 464 (1985)

C.T. Dollery, A.F. Junod

Concentration of (+)-propranolol in isolated, perfused lungs of rats
Brit. J. Pharmacol. 57: 67 - 71 (1976)

H. Donhoffer

Quantitative estimation of lipids in needle biopsy sized specimens of cadaver liver
Acta med. Acad. Sci. hung. 31: 47 - 49 (1974)

L.K. Dunn, D. Redstone, H.L. Roe, P.J. Steer, R.W. Beard
The relationship between tissue and arterial pH in
hypercarbic rabbits
Arch. Gynecol. 226: 31 - 36 (1978)

W.F. Ebling, R.L. Milsap, S.J. Szeffler, W.J. Jusko
6 α -methylprednisolone and 6 α -methylprednisone plasma
protein binding in humans and rabbits
J. Pharmaceut. Sci. 75: 760 - 763 (1986)

K. Eik-Nes, J.A. Schellman, R. Lumry, L.T. Samuels
The binding of steroids to protein
I. Solubility determinations
J. Biol. Chem. 206: 411 - 419 (1954)

C.W. Eisele, L. Eichelberger
Water, electrolyte and nitrogen content of human skin
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 58: 97 - 100 (1945)

M.B. Engel, N.R. Joseph, D.M. Laskin, H.R. Catchpole
Binding of anions by connective tissue: Dermis and cartilage
Am. J. Physiol. 201: 621 - 627 (1961)

R.J. Feldman, H.I. Maibach
Penetration of ¹⁴C hydrocortisone through normal skin
Arch. Dermatol. 91: 661 - 666 (1965)

B. Fichtl
Die Bindung von Pharmaka an menschliches Muskelgewebe
Dissertation, Universität München (1974)

B. Fichtl
Untersuchungen zur Gewebefindung von Pharmaka
Habilitationsschrift, Universität München (1983)

B. Fichtl, H. Kurz

Binding of drugs to human muscle

Europ. J. Pharmacol. 14: 335 - 340 (1978)

B. Fichtl, H. Kurz

Tissue binding of drugs: Interrelations between drug binding in different tissues and dependence on lipid solubility
Proc. 1st Europ. Congr. Biopharm. Pharmacokin.,
Clermont-Ferrand Vol. 2, pp 187 - 194 (1981)

B. Fichtl, B. Bondy, H. Kurz

Binding of drugs to muscle tissue: Dependence on drug concentration and lipid content of tissue

J. Pharmacol. Exp. Ther. 215: 248 - 253 (1980)

M.H. Freedman, R.M. Baxter, G.C. Walker

In vitro sorption of griseofulvin by keratin substrates

J. Invest. Dermatol. 38: 199 - 208 (1962)

R.K. Freinkel, R.J. Aadalen

Dietary deprivation and lipogenesis in a model sebaceous structure

J. Invest. Dermatol. 42: 325 - 331 (1964)

M. Gibaldi, J.R. Koup

Pharmacokinetic concepts - Drug binding, apparent volume of distribution and clearance

Europ. J. Clin. Pharmacol. 20: 299 - 305 (1981)

M. Gibaldi, P.J. Mc Namara

Apparent volumes of distribution and drug binding to plasma proteins and tissues

Europ. J. Clin. Pharmacol. 13: 373 - 378 (1978)

J.R. Gillette

The importance of tissue distribution in pharmacokinetics

J. Pharmacokin. Biopharm. 1: 497 - 520 (1973)

I.v. Glasenapp, G. Leonhardi

Über den Cholesterinstoffwechsel in der gesunden und
der psoriatisch veränderten Haut

Arch. Derm. Syph. 196: 148 - 154 (1953)

L.R. Goldbaum, P.K. Smith

The interaction of barbiturates with serum albumin and
its possible relation to their disposition and
pharmacological actions

J. Pharmacol. Exp. Ther. 111: 197 - 209 (1954)

M.A. Goldberg, T. Todoroff

Enhancement of diphenylhydantoin binding by lipid extraction

J. Pharmacol. Exp. Ther. 196: 579 - 585 (1976)

R.W. Goldblum, L.R. Goldbaum, W.N. Piper

Barbiturate concentrations in the skin and hair of
guinea pigs

J. Invest. Dermatol. 22: 121 - 128 (1954)

A. Goldstein

The interactions of drugs and plasma proteins

Pharmacol. Rev. 1: 102 - 165 (1949)

G.M. Gray, H.J. Yardley

Different populations of pig epidermal cells: Isolation
and lipid composition

J. Lipid Res. 16: 441 - 447 (1975)

D.M. Greenberg, M.M. Greenberg

Ultrafiltration: II. Bound water of biological colloids

J. Gen. Physiol. 16: 559 - 569 (1933)

R.H. Guy

Via transdermal ?

Pharmacy int. 6: 125 - 126 (1985)

K.M. Halprin, A. Ohkawara

Glucose entry into the human epidermis:

II. The penetration of glucose into the human epidermis
in vitro

J. Invest. Dermatol. 49: 561 - 568 (1967)

C. Hansch, A. Leo

Substituent constants for correlation analysis in
chemistry and biology

J. Wiley, New York - Chichester - Brisbane - Toronto (1979)

H. Harashima, Y. Sawada, Y. Sugiyama, T. Iga, M. Hanano
Analysis of nonlinear tissue distribution of quinidine
in rats by physiologically based pharmacokinetics

J. Pharmacokin. Biopharm. 13: 425 - 440 (1985)

R. Harris, H.E. Jones, W.A. Artis

Orally administered ketoconazole: Route of delivery to
the human stratum corneum

Antimicrob. Agents Chemother. 24: 876 - 882 (1983)

F.W. Hempelmann, N. Heinz

Lipophilie und Proteinbindung bei Cardenoliden

Drug Res. 28: 2185 - 2187 (1978)

C.D. Herzfeldt

Dissoziationskonstanten von Arzneistoffen

Pharmazeut. Ztg. 125: 608 - 614 (1980)

A.V. Hill

The state of water in muscle and blood and the osmotic
behaviour of muscle

Proc. Roy. Soc. 106: 447 - 505 (1930)

V. Höllt, H. Teschemacher

Hydrophobic interactions responsible for unspecific
binding of morphine-like drugs

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 288: 163 - 177 (1975)

R.v. Horstig

Dissertation, Universität München (in Druck)

S.L. Hsia, J.E. Fulton, D. Fulghum, M.M. Buch

Lipid synthesis from acetate-1-¹⁴C by suction blister epidermis and other skin components

Proc. Soc. exp. Biol. Med. 135: 285 - 291 (1970)

A. Hughes, H.J. Yardley

Dexamethasone receptors in human epidermis

Brit. J. Derm. 106: 299 - 302 (1982)

Y. Igari, Y. Sugiyama, S. Awazu, M. Hanano

Comparative physiologically based pharmacokinetics of hexobarbital, phenobarbital and thiopental in the rat

J. Pharmacokin. Biopharm. 10: 53 - 75 (1982)

Y. Igari, Y. Sugiyama, Y. Sawada, T. Iga, M. Hanano

Prediction of diazepam disposition in the rat and man by a physiologically based pharmacokinetic model

J. Pharmacokin. Biopharm. 11: 577 - 593 (1983)

M.J.C. Im, J.E. Hoopes

Enzymes of carbohydrate metabolism in normal human sebaceous glands

J. Invest. Dermatol. 62: 153 - 160 (1974)

M. Johnson, C. Chan, S. Cheng, J.L. Shimek, G. Nygard, S.K. Wahba Khalil

Isocratic high-performance liquid chromatographic method for the determination of tricyclic antidepressants and metabolites in plasma

J. Pharm. Sci. 71: 1027 - 1030 (1982)

A.F. Junod

Accumulation of ^{14}C -imipramine in isolated perfused rat lungs

J. Pharmacol. Exp. Ther. 183: 182 - 187 (1972)

W. J. Jusko, M. Gretch

Plasma and tissue protein binding of drugs in pharmacokinetics

Drug Metab. Rev. 5: 43 - 140 (1976)

C.L. Kapoor, C.R. Krishna Murti, P.C. Bajpai

Uptake and release of bilirubin by skin

Biochem. J. 136: 35 - 43 (1973)

N. Khalafallah, W.J. Jusko

Determination and prediction of tissue binding of prednisolone in the rabbit

J. Pharm. Sci. 73: 362 - 366 (1984)

U. Kiistala

Suction blister device for separation of viable epidermis from dermis

J. Invest. Dermatol. 50: 129 - 137 (1968)

J.E. Kirk

Hand washing

Acta Derm.-Venereol. (Stockh.) Vol. 46 Supplement 57 (1966)

Y. Kitano, N. Okada, N. Nagase

Metabolism of an aromatic retinoid Ro 10-9359 by cultured human epidermal keratinocytes

Arch. Dermatol. Res. 273: 327 - 331 (1982)

K. Koizumi, Y. Kubota, H. Miki, T. Utamura

Determination of barbiturates in mouse tissues by high-performance liquid chromatography

J. Chromatogr. 205: 401 - 412 (1981)

J. Krieglstein

Bestimmungsmethoden, physikochemische Grundlagen und
pharmakokinetische Bedeutung der Plasmaproteinbindung
von Arzneimitteln

Drug Res. 23: 1527 - 1529 (1973)

H. Kubinyi

Lipophilicity and drug activity

Prog. Drug Res. 23: 97 - 198 (1979)

R. Kuntzman, I. Tsai, J.J. Burns

Importance of tissue and plasma binding in determining
the retention of norchlorcyclizine and norcyclizine in
man, dog and rat

J. Pharmacol. Exp. Ther. 158: 332 - 339 (1967)

H. Kurz

Ein Gerät zur Herstellung dünner Schnitte aus frischem
tierischem Gewebe

Z. ges. exp. Med. 134: 304 - 309 (1961)

H. Kurz

Die Bedeutung der Lipoidlöslichkeit in der Pharmakologie
Präp. Pharmazie 6: 1 - 12 (1970)

H. Kurz

Pharmakokinetische Bedeutung der Proteinbindung

Klin. Wochschr. 56: 1195 - 1204 (1978)

H. Kurz, B. Fichtl

Binding of drugs to tissues

Drug Metab. Rev. 14: 467 - 510 (1983)

H. Kurz, H. Trunk, B. Weitz

Evaluation of methods to determine protein-binding of drugs

Drug Res. 27: 1373 - 1380 (1977)

J. Lauharanta, T. Juvakoski, L. Kanerva, A. Lassus
Pharmacokinetics of 8-methoxypsoralen in serum and suction
blister fluid
Arch. Dermatol. Res. 273: 111 - 114 (1982)

A. Leo, C. Hansch, D. Elkins
Partition coefficients and their uses
Chem. Rev. 71: 525 - 616 (1971)

E.J. Lien
Structures, properties and disposition of drugs
Prog. Drug Res. 29: 67 - 95 (1985)

J.H. Lin, Y. Sugiyama, S. Awazu, M. Hanano
Physiological pharmacokinetics of ethoxybenzamide based
on biochemical data obtained in vitro as well as on
physiological data
J. Pharmacokin. Biopharm. 10: 649 - 661 (1982)

W.E. Lindup, M.C. Orme
Plasma protein binding of drugs
Brit. Med. J. 282: 212 - 214 (1981)

V.J.W. Long
Variations in lipid composition at different depths
in cow snout epidermis
J. Invest. Dermatol. 55: 269 - 273 (1970)

H. Loth, M. Hailer
Einfluß einiger experimenteller Parameter auf die Pene-
tration von Arzneistoffen in exzidierte, menschliche Haut
Acta Pharmaceutica Technologica 29: 181 - 186 (1983)

T.M. Ludden, L.S. Schanker, R.C. Lanman
Binding of organic compounds to rat liver and lung
Drug Metab. Dispos. 4: 8 - 16 (1976)

H. Lüllmann, M. Wehling

The binding of drugs to different polar lipids in vitro
 Biochem. Pharmacol. 28: 3409 - 3415 (1979)

N.G. Lundquist, S. Ullberg

Autoradiography of ³⁵S-chlorpromazine: Accumulation and
 retention in melanin-bearing tissues

The phenothiazines and structurally related drugs

I.S. Forrest, C.J. Carr, E. Usdin

Raven Press - New York (1974)

S.L. Markantonis, A. Kyroudis, A.H. Beckett

Evaluation of the percutaneous absorption and metabolism
 of some aminopropiophenones

J. Pharm. Pharmacol. 38: 515 - 519 (1986)

M.J. Marples

The ecology of the human skin

C.C. Thomas (edt.) (1965)

W. Martindale

The Extrapharmacopoeia

Pharmaceutical Press - London (1977)

A.G. Matoltsy, F.S.M. Herbst

A study of human epidermal proteins

J. Invest. Dermatol. 26: 339 - 342 (1956)

E. Menczel, S. Goldberg

pH effect on the percutaneous penetration of lignocaine
 hydrochloride

Dermatologica 156: 8 - 14 (1978)

E. Menczel, H.I. Maibach

In vitro human percutaneous penetration of benzyl alcohol
 and testosterone: Epidermal - dermal retention

J. Invest. Dermatol. 54: 386 - 394 (1970)

E. Menczel, H.I. Maibach

Chemical binding to human dermis in vitro testosterone
and benzyl alcohol

Acta Derm.-Venereol. (Stockh.) 52: 38 - 42 (1972)

E. Menczel, D. Bucks, H.I. Maibach, R. Wester

Malathion binding to sections of human skin: Skin capacity
and isotherm determinations

Arch. Dermatol. Res. 275: 403 - 406 (1983)

E. Menczel, D. Bucks, H.I. Maibach, R. Wester

Lindane binding to sections of human skin: Skin capacity
and isotherm determinations

Arch. Dermatol. Res. 276: 326 - 329 (1984)

E. Menczel, D. Bucks, R. Wester, H.I. Maibach

Skin binding during percutaneous penetration
Percutaneous Absorption; R.L. Bronaugh, H.I. Maibach

Marcel Dekker Inc. - New York - Basel (1985)

H.F. Merk

Fremdstoffmetabolismus in Haut und menschlichen Haarbulbi
Fortschr. Med. 103: 457 - 460 (1985)

W. Meuldermans, R. Hurkmans, E. Swijssen, J. Heykants

The binding of R 41400 to human plasma proteins and blood
cells, and to subcellular fractions of rat liver, lung,
kidney and small intestine

Janssen Preclinical Research Report (1978)

M.C. Meyer, D.E. Guttman

The binding of drugs by plasma proteins

J. Pharm. Sci. 57: 895 - 918 (1968)

M. Michiels, L. Michielsen, R. Woestenborghs, R. Hendriks,
J. Heykants

Absorption and distribution of ^3H -ketoconazole following
oral administration to the male and female Wistar rat
Janssen Preclinical Research Report (1979)

B. Morsches, H. Holzmann, G.W. Korting

Untersuchungen zum quantitativen Verhalten von Kollagen
und nichtkollagenem Eiweiß in der menschlichen Haut in
Abhängigkeit von Alter und Lokalisation

Arch. klin. exp. Derm. 224: 117 - 127 (1966)

W.E. Müller

Die Plasmaproteinbindung von Pharmaka

Med. Mo. Pharm. 5: 302 - 310 (1982)

A.S. Mundo, A. Bonaccorsi, S.R. Bareggi, R. Franco,
P.L. Morselli, E. Riva, S. Garattini

Relationships between tricyclic antidepressant
concentrations, 1- ^3H -noradrenaline uptake and chrono-
tropic effect in isolated rat atria

Europ. J. Pharmacol. 28: 368 - 375 (1974)

P. Netter, G. Fraure, M.C. Regent, J.A. Procknal, G. Levy
Salicylate kinetics in old age

Clin. Pharmacol. Ther. 38: 6 - 11 (1985)

P.C.H. Newbold

Distribution of methotrexate in rat tissues

Brit. J. Derm. 90: 669 - 677 (1974)

N. Nicolaides

Human skin surface lipids - origins, composition and
possible function

Advances in biology of skin Vol. 4. The sebaceous glands
Pergamon Press - Oxford (1963)

I. Nosak

Einfluß der H^+ -Konzentration auf die Bindung von Pharmaka an Gewebe unter Berücksichtigung der Organunterschiede
Dissertation, Universität München (1983)

A. Nyfors, H.W. Rothenborg

Cutaneous blood flow in psoriasis measured by 133 xenon clearance

J. Invest. Dermatol. 54: 381 - 385 (1970)

D.E. Ong, F. Chytil

Retinoic acid-binding protein in rat tissue

J. Biol. Chem. 250: 6113 - 6117 (1975)

H. Osamura

Penetration of topical corticosteroids through human epidermis

J. Derm. 9: 45 - 58 (1982)

A. Pannatier, P. Jenner, B. Testa, J.C. Etter

The skin as a drug-metabolizing organ

Drug Metab. Rev. 8: 319 - 343 (1978)

J.S. Pasricha, K.C. Kandhari

Evaluation of different methods for extraction of soluble proteins from skin

Dermatologica 140: 84 - 87 (1970)

J.S. Pasricha, K.C. Kandhari

Soluble epidermal proteins

Dermatologica 140: 88 - 92 (1970)

J.F. Patterson, R.D. Griesemer

Lipogenesis in human skin

J. Invest. Dermatol. 33: 281 - 285 (1959)

R.D.G. Peachey

Skin temperature and blood flow in relation to the speed of suction blister formation

Brit. J. Derm. 84: 447 - 452 (1971)

G. le Petit

Die pH-abhängige Lipidlöslichkeit von Arzneistoffen

Pharmazie 35: 696 - 698 (1980)

S. Pfeiffer, P. Pflegel, H.H. Borchert

Grundlagen der Biopharmazie

VEB Verlag - Berlin (1984)

P.E. Pochi, D.T. Downing, J.S. Strauss

Sebaceous gland response in man to prolonged total caloric deprivation

J. Invest. Dermatol. 55: 303 - 309 (1970)

M. Ponec, J.A. Kempenaar

Biphasic entry of glucocorticoids into cultured human skin keratinocytes and fibroblasts

Arch. Dermatol. Res. 275: 334 - 344 (1983)

J. Prochazka Fisher

Soluble substances of human stratum corneum

I. Immunochemical and immunological study

J. Invest. Dermatol. 44: 43 - 50 (1965)

S.M. Puhvel, M. Sakamoto

Cellular retinoid acid-binding proteins in human epidermis and sebaceous follicles

J. Invest. Dermatol. 82: 79 - 84 (1984)

H.M. Rauen

Biochemisches Taschenbuch

Springer Verlag - Berlin - Göttingen - Heidelberg (1956)

R.P. Reinertson, V.R. Wheatley

Studies on the chemical composition of human epidermal lipids

J. Invest. Dermatol. 32: 49 - 59 (1959)

A.G. Renwick

Pharmacokinetics in toxicology

A.W. Hayes; Principles and methods of toxicology

Raven Press - New York (1982)

O. Rollman, A. Vahlquist

Psoriasis and vitamin A

Arch. Dermatol. Res. 278: 17 - 24 (1985)

L. Sachs

Angewandte Statistik

Springer Verlag - Berlin - Heidelberg - New York - Tokyo (1984)

A. Saifer, N.I. Feldman

The photometric determination of gangliosides with the sulpho-phospho-vanillin reaction

J. Lip. Res. 12: 112 - 115 (1971)

M.M. Saket, K.C. James, I.W. Kellaway

A comparison of human stratum corneum - normal saline with other partitioning systems

J. Pharm. Pharmacol. 36: 9 P (1984)

N.P. Salzman, B.B. Brodie

Physiological disposition and fate of chlorpromazine

and a method for its estimation in biological material

J. Pharmacol. Exp. Ther. 118: 46 - 54 (1956)

W.M. Sams, J.H. Epstein

The affinity of melanin for chloroquine

J. Invest. Dermatol. 45: 482 - 488 (1965)

M. Schäfer-Korting, H.C. Korting, E. Mutschler

Human plasma and skin blister fluid levels of griseofulvin following a single oral dose

Europ. J. Clin. Pharmacol. 29: 109 - 113 (1985)

M. Schäfer-Korting, H.C. Korting, M. Dorn, E. Mutschler
Ketoconazole concentrations in human skin blister fluid
and plasma

Int. J. Clin. Ther. Toxicol. 22: 371 - 374 (1984)

M. Schäfer-Korting, H.C. Korting, L. Maaß, N. Klesel,
H.-G. Grigoleit, E. Mutschler

Cefodizime penetration into skin suction blister fluid
following a single intravenous dose

Europ. J. Clin. Pharmacol. 30: 295 - 298 (1986)

R.J. Scheuplein, I.H. Blank

Permeability of the skin

Physiol. Rev. 51: 702 - 747 (1971)

P. Schmid

Extraction and purification of lipids:

II. Why is chloroform-methanol such a good lipid solvent

Physiol. Chem. Physics 5: 141 - 150 (1973)

P. Schmid, B. Chelf

Influence of lipophilic substances on fungal infections
of the human skin

I. What constitutes a good lipid extractant?

Dermatologica 152: 23 - 32 (1976)

P. Schmid, E. Hunter

Extraction and purification of lipids

I. Solubility of lipids in biologically important solvents

Physiol. Chem. Physics 3: 98 - 102 (1971)

W. Scholtan

Die hydrophobe Bindung der Pharmaka an Humanalbumin
und Ribonucleinsäure

Drug Res. 18: 505 - 517 (1968)

W. Scholtan

Bestimmungsmethoden und Gesetzmäßigkeiten der Serum-
proteinbindung von Arzneimitteln

Drug Res. 28: 1037 - 1047 (1978)

G. Schuhmann

Beziehungen zwischen der Bindung von Pharmaka an Plasma
und Gewebe in vitro und ihrer Verteilung in vivo

Dissertation, Universität München (1985)

E.J. van Scott

Mechanical separation of the epidermis from the corium

J. Invest. Dermatol. 18: 377 - 379 (1952)

J.K. Seydel, K.J. Schaper

Quantitative structure - pharmacokinetic relationship
in drug design

Pharmac. Ther. 15: 131 - 182 (1982)

J.K. Seydel, O. Wassermann

NMR-studies on the molecular basis of drug induced
phospholipidosis. II. Interaction between several
amphiphilic drugs and phospholipids

Biochem. Pharmacol. 25: 2357 - 2364 (1976)

G.P. Sgaragli, L. Della Corte, D. Gremigni
Chlorimipramine - induced phospholipidosis: Biochemical
and pharmacokinetic observations in the rat
Pharmacol. Res. Com. 15: 231 - 246 (1983)

H.M. Siefert, D. Maruhn, H. Scholl
Pharmacokinetics of ciprofloxacin
2nd communication: Distribution to and elimination from
tissues and organs following single or repeated ad-
ministration of (¹⁴C)ciprofloxacin in albino rats
Drug Res. 36: 1503 - 1510 (1986)

G. Siegenthaler, J.H. Saurat, C. Morin, R. Hotz
Cellular retinol- and retinoic acid-binding proteins
in the epidermis and dermis of normal human skin
Brit. J. Derm. 111: 647 - 654 (1984)

H. Skelton
The storage of water by various tissues of the body
Arch. Intern. Med. 40: 140 - 152 (1927)

T.J. Slaga, S. Thompson, J.A. Schwarz
Binding of dexamethasone by the subcellular fractions
of mouse epidermis and dermis
J. Invest. Dermatol. 68: 307 - 309 (1977)

G. Stüttgen
Drug absorption by intact and damaged skin
Dermal and transdermal absorption; R. Brandau, B.H. Lippold
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft - Stuttgart (1982)

G. Stüttgen, H. Schäfer
Funktionelle Dermatologie
Springer Verlag - Berlin - Heidelberg - New York (1974)

G. Sturbois, S. Uzan, B. Rotten, G. Breart, C. Sureau
 Continuous subcutaneous pH measurement in human fetuses.
 Correlations with scalp and umbilical blood pH
 Amer. J. Obstet. Gynec. 128: 901 - 903 (1977)

W.K. Surewicz, W. Leyko
 Interaction of local anaesthetics with model phospholipid
 membranes. The effect of pH and phospholipid composition
 studied by quenching of an intramembrane fluorescent probe
 J. Pharm. Pharmacol. 34: 359 - 363 (1982)

J. Swarbrick, G. Lee, J. Brom, N.P. Gensmantel
 Drug permeation through human skin II: Permeability of
 ionizable compounds
 J. Pharmaceut. Sci. 73: 1352 - 1355 (1984)

A. Szakall
 Hautphysiologische Forschung und Gesunderhaltung der Haut
 Fette und Seifen 53: 399 - 405 (1951)

U. Täuber
 Metabolism of drugs on and in the skin
 Dermal and transdermal absorption; R. Brandau, B.H. Lippold
 Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft - Stuttgart (1982)

U. Täuber, T. Toda
 Biotransformation von Diflucortolonvalerianat in der
 Haut von Ratte, Meerschweinchen und Mensch
 Drug Res. 26: 1484 - 1487 (1976)

S. Tajima, T. Nishikawa, H. Hatano, Y. Nagai
 Distribution of macromolecular components in human
 dermal connective tissue
 Arch. Dermatol. Res. 273: 115 - 120 (1982)

J.R. Taylor, K.M. Halprin

Methotrexate uptake by psoriatic epidermis

Brit. J. Derm. 96: 167 - 170 (1977)

H. Tormä, A. Vahlquist

Vitamin A uptake by human skin in vitro

Arch. Dermatol. Res. 276: 390 - 395 (1984)

T.N. Tozer

Concepts basic to pharmacokinetics

Pharmac. Ther. 12: 109 - 131 (1981)

A. Tsuji, K. Nishide, H. Minami, E. Nakashima, T. Terasaki,
T. Yamana

Physiologically based pharmacokinetic model for cefazolin
in rabbits and its preliminary extrapolation to man

Drug Metab. Dispos. 13: 729 - 739 (1985)

N. Touroutoglou

Dissertation, Universität München (in Druck)

A. Vahlquist, J.B. Lee, G. Michaelsson, O. Rollman

Vitamin A in human skin: II. Concentrations of carotene,
retinol and dehydroretinol in various components of
normal skin

J. Invest. Dermatol. 79: 94 - 97 (1982)

L.A. Verbruggen, D.S. Salomon

Glucocorticoid receptors and inhibition of neonatal mouse
dermal fibroblast growth in primary culture

Arch. Dermatol. Res. 269: 111 - 126 (1980)

B.J. Vermeer, F.C. Reman, C.M. van Gent

The determination of lipids and proteins in suction
blister fluid

J. Invest. Dermatol. 73: 303 - 305 (1979)

- G. Volden, A.K. Thorsrud, I. Bjørnson, E. Jellum
Biochemical composition of suction blister fluid determined by high resolution multicomponent analysis (capillary gas chromatography - mass spectrometry and two-dimensional electrophoresis)
J. Invest. Dermatol. 75: 421 - 424 (1980)
- H. Walther, F.P. Meyer
Interindividual differences of protein binding in man
Int. J. Clin. Pharm. Biopharm. 17: 392 - 395 (1979)
- P.H. Wang, E.J. Lien
Effects of different buffer species on partition coefficients of drugs used in quantitative structure-activity relationships
J. Pharm. Sci. 69: 662 - 668 (1980)
- A. Ward, R.N. Brogden, R.C. Heel, T.M. Speight, G.S. Avery
Isotretinoin - a review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in acne and other skin disorders
Drugs 28: 6 - 37 (1984)
- S.S. West, R.E. Hurst, J.M. Menter
Thermodynamics of mucopolysaccharide - dye binding
I. Identification of free and bound dye via membrane filtration: Acridine orange - dermatan sulfate system
Biopolymers 16: 685 - 693 (1977)
- R.C. Wester, H.I. Maibach
Cutaneous pharmacokinetics: 10 steps to percutaneous absorption
Drug Metab. Rev. 14: 169 - 205 (1983)
- V.R. Wheatley, R.P. Reinertson
The presence of vitamin D precursors in human epidermis
J. Invest. Dermatol. 31: 51 - 54 (1958)

D.I. Wilkinson, M.A. Karasek

Skin lipids of a normal and mutant (asebic) mouse strain
J. Invest. Dermatol. 47: 449 - 455 (1966)

P.W. Wolpert, K. Noller, D. Shaughnessy, D.N. Houchin,
M.E. Baccari, F.A. Miller

Tissue pH: A new clinical tool
Arch. Surg. 101: 308 - 312 (1970)

A.M. Worm

Exchange of macromolecules between plasma and skin
interstitium in extensive skin disease
J. Invest. Dermatol. 76: 489 - 492 (1981)

W.D. Wosilait

The accumulation and distribution of dicoumarol in
rat liver slices
Biochem. Pharmacol. 17: 429 - 437 (1968)

P.A. Wyss, S. Mühlebach, M.H. Bickel

Pharmacokinetics of 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl
(6-CB) in rats with decreasing adipose tissue mass
I. Effects of restricting food intake two weeks after
administration of 6-CB
Drug Metab. Dispos. 10: 657 - 661 (1982)

A. Yacobi, J.A. Udall, G. Levy

Intrasubject variation of warfarin binding to protein
in serum of patients with cardiovascular disease
Clin. Pharmacol. Ther. 20: 300 - 303 (1976)

S.J.C. Yeh, G.A. Leveille

Significance of skin as a site of fatty acid and
cholesterol synthesis in the chick
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 142: 115 - 119 (1973)

T. Yoshikawa, Y. Sugiyama, Y. Sawada, T. Iga, M. Hanano
Effect of pregnancy on tissue distribution of salicylate
in rats

Drug Metab. Dispos. 12: 500 - 505 (1984)

A. Zesch

Methods for evaluation of drugs concentration in human
skin

Dermal and transdermal absorption; R. Brandau, B.H. Lippold
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft - Stuttgart (1982)

N. Zöllner, K. Kirsch

Über die quantitative Bestimmung von Lipoiden (Mikro-
methode) mittels der vielen natürlichen Lipoiden
(allen bekannten Plasmalipoiden) gemeinsamen Sulpho-
phospho-Vanillin Reaktion

Z. ges. exp. Med. 135: 545 - 561 (1962)

H. LEBENS LAUF

Name: Kersten Andreas WALTER
 Geburtstag: 30.10.1956
 Geburtsort: Hannover

Schulbildung: 1963 bis 1967 Grundschule in Kaufering
 bei Landsberg/Lech
 1967 bis 1971 Gymnasium Landstuhl/Pfalz
 1971 bis 1977 Dominikus Zimmermann Gymna-
 sium Landsberg/Lech
 Zeugnis der allgemeinen Hochschulreife
 vom 24.6.1977

Studium: SS 1978 Studium für das Lehramt Grund-
 und Hauptschule an der Ludwig-Maximilians-
 Universität München
 WS 1978/79 Beginn des Pharmaziestudiums
 an der Ludwig-Maximilians-Universität
 München
 Pharmaziepraktikum von Mai 1982 bis April
 1983 in der Markus Apotheke München
 28.6.1983 Pharmazeutische Prüfung in
 München
 15.7.1983 Approbation als Apotheker

Wissenschaftliche
 Tätigkeit: Dezember 1983 bis Dezember 1986 unter An-
 leitung von Prof. Dr. H. Kurz am Walther-
 Straub-Institut für Pharmakologie und Toxi-
 kologie der Ludwig-Maximilians-Universität
 München

Berufliche
 Tätigkeit: April 1985 bis Dezember 1986 wissenschaft-
 liche Hilfskraft (teilzeit beschäftigt) am
 Walther-Straub-Institut für Pharmakologie
 und Toxikologie

